

Verteilung und Ausscheidung der trypanociden
Diamidine 6-Amidino-2-(4-amidinophenyl) indol
bei Maus und Rind sowie
6-Amidino-2-(4-amidinophenyl) thionaphthen
und 5-Amidino-2-(4-amidinophenyl) benzofuran
bei der Maus

von
Gerald Kaliwoda
aus Oderberg

Verteilung und Ausscheidung der trypanociden
Diamidine 6-Amidino-2-(4-amidinophenyl) indol
bei Maus und Rind sowie
6-Amidino-2-(4-amidinophenyl) thionaphthen
und 5-Amidino-2-(4-amidinophenyl) benzofuran
bei der Maus

Den Naturwissenschaftlichen Fachbereichen
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur

Erlangung des Doktorgrades

vorgelegt von
Gerald Kaliwoda
aus Oderberg

Als Dissertation genehmigt von den
Naturwissenschaftlichen Fachbereichen der Universität
Erlangen-Nürnberg



Tag der mündlichen Prüfung: 24. November 1976

Vorsitzender der
Promotionskommission : Professor Dr. H. R e m m e r t

Erstberichterstatter : Professor Dr. O. D a n n

Zweitberichterstatter : Professor Dr. H. H o f m a n n

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 1972 bis August 1976 im Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie, Lehrstuhl für Angewandte Chemie, der Universität Erlangen-Nürnberg ausgeführt.

Aufrichtiger Dank gilt meinem Lehrer, Herrn Professor Dr. O. D a n n, für Erteilung und wohlwollende Förderung der Arbeit.

Herrn Privatdozent Dr. Dr. E. F i n k danke ich für freundliche Hilfe und Ratschläge bei Durchführung der Tierversuche.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

	<u>Zusammenfassung</u>	1
1.	<u>Ausgangspunkt und Zielsetzung</u>	
	<u>der Untersuchungen</u>	3
1.1.	Entwicklung der trypanociden Diamidine	3
1.2.	Spezifität, Wirksamkeit und Toxizität der Diamidine	7
1.3.	Theorien zur Wirkungsweise der Diamidine	12
1.4.	Zusammenhang - Pharmakokinetik und Prophylaxe	14
1.5.	Absicht bzw. Ziel der eigenen Untersuchungen	15
2.	<u>Nachweisverfahren</u>	16
2.1.	<u>Meßmethode</u>	16
2.1.1.	Bisher angewandte Methoden	16
2.1.1.1.	Absorptionsphotometrie	16
2.1.1.2.	Fluorimetrie	17
2.1.1.3.	Isotopenmarkierung	17
2.1.1.4.	Glyoxalmethode	18
2.1.2.	Eigene Bestimmungsmethode	19
2.1.2.1.	Fluorimetrie	19
2.1.2.2.	Bestimmung der Eigenfluoreszenz mittels der Lösungs- fluorimetrie	19
2.1.2.3.	Fluoreszenz nach chemischer Umwandlung	24
2.1.2.3.1.	Oxidation von 98/202 zum Sulfon	24
2.1.2.3.2.	Versuch der Umwandlung von Berenil zum fluores- zierenden Benzotriazol	26
2.2.	<u>Chromatographie der Diamidine</u>	32
2.2.1.	Wahl des Chromatographieverfahrens	32
2.2.2.	Arbeitsweise mit innerem Standard	33
2.2.3.	Wahl des DC-Systems	34
2.2.3.1.	Wahl des Adsorbens	34
2.2.3.2.	Wahl des Fließmittels	36

2.3.	<u>In situ - Fluorimetrie</u>	38
2.3.1.	Vorteile der Methode	38
2.3.2.	Meßplatzbeschreibung	38
2.3.3.	Spektrale Intensitätsverteilung	40
2.3.4.	Fluoreszenzintensitätsortskurven	42
2.3.5.	Linearer Meßbereich	44
2.3.6.	Photostabilität der Diamidine	46
2.3.7.	Präzision der Meßmethode	49
2.4.	<u>Anreicherungsverfahren</u>	51
2.4.1.	Wahl des Gefäßmaterials	51
2.4.1.1.	Verdrängung der Diamidine durch strukturähnliche Substanzen	51
2.4.1.2.	Einfluß von Guanidin auf die Glaswandadsorption ver- schiedener Diamidine	53
2.4.1.3.	Einfluß des Gefäßmaterials auf die Adsorption	54
2.4.2.	Wahl des Anreicherungsverfahrens	56
2.4.3.	Wahl des Extraktionsmittels	57
2.4.4.	Beständigkeit der Diamidine gegen Natronlauge	58
3.	<u>Tierversuche</u>	59
3.1.	<u>Wahl der Versuchstiere</u>	59
3.2.	<u>Mäuseversuche</u>	60
3.2.1.	Tierhaltung	60
3.2.2.	Dosierung und Applikation der Diamidine	61
3.2.3.	Probengewinnung	62
3.2.3.1.	Serum	62
3.2.3.2.	Harn und Faeces	63
3.2.3.3.	Organe	63
3.2.4.	Probenvorbereitung und Aufbewahrung	63
3.2.5.	Probenaufarbeitung	64
3.2.5.1.	Harn und Serum ohne Anreicherung	64
3.2.5.2.	Extraktion und Anreicherung der Organproben	64

3.2.5.2.1.	Homogenisierung der Proben	64
3.2.5.2.2.	Guanidinzusatz	65
3.2.5.2.3.	Anreicherung	66
3.2.6.	Berechnung der Ergebnisse	66
3.2.7.	Reproduzierbarkeit der Ergebnisse	67
3.2.7.1.	Bestimmung der Wiederfindungsraten	67
3.2.7.2.	Relation der Wiederfindungsraten von innerem Standard zur Substanz	70
3.2.7.3.	Präzision und Richtigkeit	71
3.3.	<u>Ergebnisse der Mäuseversuche</u>	72
3.3.1.	Serumspiegel und pharmakokinetische Daten	72
3.3.2.	Harn- und Faeceselimination	79
3.3.3.	Metabolisierung von 192/208 zu 102/198	84
3.3.4.	Organkonzentrationen	85
3.4.	<u>Orientierender Versuch mit 102/198 beim Kalb</u>	87
3.4.1.	Tierhaltung	87
3.4.2.	Applikation, Gewinnung und Aufarbeitung der Proben	87
3.5.	<u>Ergebnisse des Kälbersversuches</u>	88
3.5.1.	Serumspiegel	88
3.5.2.	Harn- und Faeceselimination	88
3.5.3.	Organkonzentrationen	89
3.6.	<u>Vergleichende Betrachtung der Ergebnisse</u>	90
3.6.1.	Vergleich der Diamidine untereinander bei der Maus	90
3.6.2.	Vergleich mit bekannten Diamidinen der Literatur	92
3.6.3.	Vergleich Maus - Kalb	95
4.	<u>Allgemeine Angaben</u> <u>zum experimentellen Teil</u>	98
4.1.	Allgemeine Angaben zu präparativen und analytischen Darstellungsmethoden	98
4.2.	Geräte für die Tierversuche	99
4.3.	Materialien, Reagenzien und Lösungsmittel	100
4.4.	Reinigung von Gefäßen zum analytischen Verfahren	102

5.	<u>Arbeitsvorschriften zum</u>	
	<u>Nachweisverfahren</u>	103
5.1.	<u>Präparative und analytische Darstellungen</u>	103
5.1.1.	Oxidationsversuch von 6-Amidino-2-(4-amidinophenyl)- thionaphthen zum 1,1-dioxid	103
5.1.2.	6-Carbamoyl-2-(4-carbamoylphenyl) thionaphthen zum DC-Vergleich	104
5.1.3.	2-(4-Cyanophenyl)-4,5-dimethoxybenztriazol (X)	105
5.1.4.	2-(4-Amidinophenyl)-4,5-dimethoxybenztriazol- hydrochlorid (XI)	106
5.1.5.	Decan-1,10-diamidin-dihydrochlorid	107
5.1.6.	Nachweis von Berenil nach Umwandlung zum fluoreszieren- den 2-(4-Amidinophenyl)-4,5-dimethoxybenztriazol	108
5.2.	<u>Fluorimetrie</u>	109
5.2.1.	Lösungsfluorimetrie	109
5.2.2.	Beobachtungen über den Einfluß von Lanette E auf die Fluoreszenz von 98/202, 102/198 und 150/49	110
5.2.3.	In situ - Fluorimetrie	112
5.2.3.1.	Geräteeinstellung und Meßdaten	112
5.2.3.2.	Durchführung der Messung	114
5.3.	<u>Arbeitsvorschriften zur Dünnschichtchromatographie</u>	115
5.3.1.	Herstellung der Dünnschichtplatten	115
5.3.2.	Auswahl und Vorbereitung der Platten	115
5.3.3.	Durchführung der Chromatographie	116
5.3.3.1.	Auftragen der Proben	116
5.3.3.2.	Chromatographie unter Stickstoff	116
5.3.3.3.	Vorbereitung des Chromatogrammes zur Messung	117

6.	<u>Vorschriften zu den Tierversuchen</u>	118
6.1.	<u>Tierhaltung</u>	118
6.2.	<u>Injektionen</u>	118
6.2.1.	Herstellung der Injektionslösungen	118
6.2.2.	Applikation der Injektionslösungen	119
6.3.	<u>Probengewinnung</u>	120
6.3.1.	Serum	120
6.3.2.	Organe	120
6.3.3.	Harn und Faeces	121
6.3.4.	Vergleichsproben	121
6.4.	<u>Zugabe von innerem Standard</u>	122
6.5.	<u>Extraktion und Anreicherung der Proben</u>	123
6.5.1.	Homogenisieren von Gewebe	123
6.5.2.	Extraktion der Diamidine	123
6.6.	<u>Berechnung der Analysen</u>	125
6.6.1.	Verwendete Wiederfindungsraten-Quotienten	126
6.6.2.	Harn und Serum	126
6.6.3.	Faeces und Organproben	127
6.6.4.	Berechnung der pharmakokinetischen Serumdaten	128
	Literaturverzeichnis	129

ZUSAMMENFASSUNG

Die trypanociden, fluoreszierenden Diamidine 98/202, 6-Amidino-2-(4-amidinophenyl)thionaphthen, 102/198, 6-Amidino-2-(4-amidinophenyl)-indol, und 150/49, 5-Amidino-2-(4-amidinophenyl)benzofuran, wurden nach Applikation bei Mäusen, 102/198 zusätzlich bei einem Kalb, aus Blut, Exkrementen und Organen extrahiert, dünnschichtchromatographisch getrennt und mittels in situ-Fluorimetrie bestimmt.

Die Probenaufarbeitung erfolgte unter Verwendung eines inneren Standards; die Nachweisgrenze der Methode lag bei $0.02 \mu\text{g/g}$ organischem Material.

Bei der Maus wurde nach intraperitonealer Injektion von 10 mg/kg eine rasche Invasion der Diamidine ins Blut mit Serummaxima nach 0.25 Stunden gefunden. Die Elimination erfolgte zweiphasig mit Halbwertszeiten von 0.2 - 0.3 Stunden in der ersten, ungefähr einstündigen Phase und mit Halbwertszeiten von 2 - 8 Stunden in der zweiten Phase. Die höchsten nach 0.25 Stunden erreichten Serumkonzentrationen betrugen bei 102/198 etwa $5 \mu\text{g/ml}$, bei 150/49 etwa $2 \mu\text{g/ml}$ und bei 98/202 etwa $1 \mu\text{g/ml}$. Die Halbwertszeiten in der zweiten Eliminationsphase beliefen sich bei 150/49 auf 8 Stunden, bei 102/198 auf 4 Stunden und bei 98/202 auf 2 Stunden.

Eine hohe Anreicherung wurde in Leber und Nieren gefunden mit Gewebekonzentrationen um $60 \mu\text{g/g}$ in der Leber und $100 \mu\text{g/g}$ in den Nieren nach 24 Stunden; nach 14 Tagen betrugen sie ungefähr $4\text{-}10 \mu\text{g/g}$ und $16 \mu\text{g/g}$. Am längsten wurde 98/202 in der Maus gespeichert; nach 14 Tagen waren erst etwa 45 % der applizierten Menge ausgeschieden, von 102/198 etwa 54 % und von 150/49 etwa 63 %.

Bei der orientierenden Untersuchung des gegen Rindertrypanosomiasen hochwirksamen 102/198 an einem Kalb konnte gegenüber der Maus eine wesentlich verzögerte Ausscheidung festgestellt werden.

Nach intraglütäaler Injektion von 10 mg/kg wurde nach 0.5 Stunden eine Serumkonzentration von 1.8 µg/ml beobachtet. Nach 7 Tagen begann eine zweite, konstante Eliminationsphase mit einer Serumkonzentration von 0.065 µg/ml, die nach 23 Tagen auf 0.049 µg/ml gesunken war, was einer Eliminationshalbwertszeit von 38 Tagen entsprach.

Nach 79 Tagen wurden in der Leber mit 100 µg/g und in den Nieren mit 60 µg/g die höchsten Organkonzentrationen gefunden.

Die Gesamtausscheidung betrug nach 79 Tagen etwa 18 % der applizierten Substanzmenge.

1. Ausgangspunkt und Zielsetzung der Untersuchungen

1.1. Entwicklung der trypanociden Diamidine

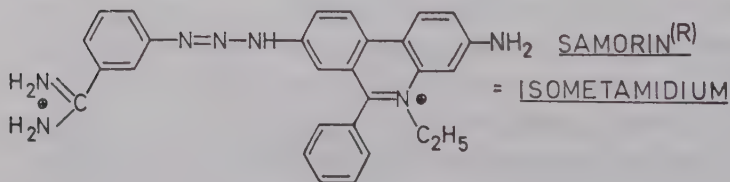
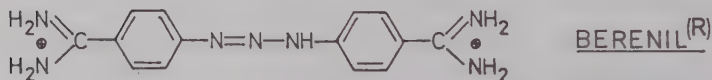
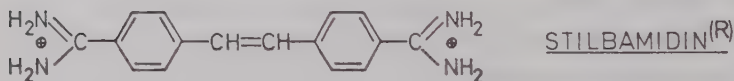
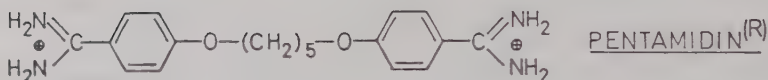
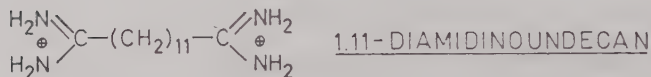
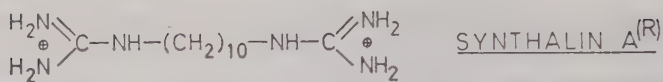
Die Einführung der Diamidine in die Chemotherapie der afrikanischen Trypanosomiasen geht auf die Beobachtung zurück, daß für Trypanosomen bezüglich Überlebensdauer, Motilität und Vermehrungsrate eine starke Abhängigkeit vom Glukoseangebot besteht ^{1, 2, 3, 4)}.

Daher suchte man zuerst unter den bekannten blutzuckersenkenden Substanzen nach einem Ersatz der bis dahin zur Behandlung der Trypanosomiasen hauptsächlich verwendeten Mittel Tryparsamid und Germanin^(R). Unter zahlreichen Hypoglykämie erzeugenden Guanidinderivaten fanden von Jansc6 und von Jansc6 1935 für Synthalin^(R) (Formelübersicht 1), 1.10-Diguanidinodecan, eine gute trypanocide Wirksamkeit ⁵⁾, was von Schern und Artagaveytia-Allende ⁶⁾ bestätigt wurde. Lourie und Yorke ⁷⁾ konnten jedoch zeigen, daß diese Wirkung nicht über die indirekte Blutzuckersenkung zustande kam, sondern auf einer spezifischen Toxizität für die Trypanosomen beruhen mußte, die bereits durch wesentlich geringere Konzentrationen der Substanz erreicht wurde als für eine Hypoglykämie nötig waren.

Noch deutlicher war der trypanocide Effekt mit den den Diguanidinen entsprechenden aliphatischen Diamidinen, wie King, Lourie und Yorke ^{8, 9)} erkannten, wobei sich 1.10-Diamidinoundecan-dihydrochlorid (Formelübersicht 1) als am besten erwies.

Bei MAY & BAKER Ltd., England, entwickelte man daraufhin weitere aliphatische, aber auch aromatische Diamidine und erzielte für letztere eine deutliche Wirkungssteigerung. Dies führte zu den 1939 und 1942 in den Handel gebrachten, stark trypanociden Verbindungen Stilbamidin^(R) ¹⁰⁾, trans-4.4'-Diamidinostilben, und Pentamidin^(R) ¹¹⁾, 1.5-Bis-(4-amidinophenoxy)pentan (Formelübersicht 1). Sie wirken hauptsächlich gegen die humanpathogenen Trypanosomen ¹²⁾ der T. brucei -

FORMELÜBERSICHT 1



Gruppe, *T. rhodesiense* und *T. gambiense*, kaum gegen das rinder-pathogene *T. congolense*. Aus Gründen der Phototoxizität^{13, 14, 15)} und Photolabilität^{16, 17)} des Stilbamidins konnte sich das stabile Pentamidin zur Behandlung und Prophylaxe der durch *T. gambiense* verursachten menschlichen Schlafkrankheit durchsetzen.

Trotz zahlreicher Variationen dieses Verbindungstyps wurde keine bedeutende Wirksamkeitssteigerung mehr erreicht.

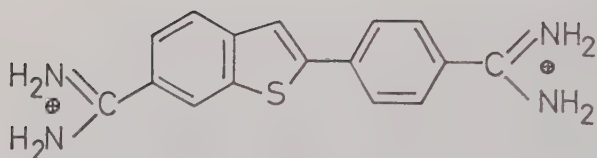
Erst etwa 15 Jahre später entwickelte Jensch¹⁸⁾ in den Farbwerken HOECHST ein gegen Babesien sowie gegen *T. congolense* und *T. vivax* äußerst wirksames aromatisches Diamidin, bei dem die beiden Benzamindinlanken mit einer Triazen-Brücke verknüpft wurden, das als Berenil^(R)¹⁹⁾, 1,3-Bis-(4-amidinophenyl) triazen (Formelübersicht 1) in den Handel kam. Es wird von der Firma ausschließlich als veterinärmedizinisches Präparat deklariert, stellt aber auch ein brauchbares Arzneimittel zur Behandlung der hämo-lymphatischen ersten Phase der menschlichen Trypanosomiasen dar^{20, 21)}.

MAY & BAKER kombinierte Berenil mit dem ebenfalls stark *T. congolense* wirksamen Ethidium^(R)²²⁾, 3,8-Diamino-5-äthyl-6-phenylphenanthridinium bromid, der Firma BOOTS, England, zu Samorin^(R)^{23, 24)} (Formelübersicht 1), 8-(3-Amidinophenyl-diazoamino)-3-amino-5-äthyl-6-phenylphenanthridinium chlorid-hydrochlorid, das gegen *T. congolense* höchst wirksam ist und zudem gute prophylaktische Eigenschaften besitzt.

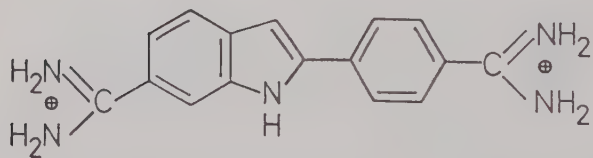
Wegen der erwähnten Instabilität des Stilbamidins bei Lichteinwirkung²⁵⁾, die sowohl Dimerisierung als auch Umlagerung zum praktisch unwirksamen cis-Stilben²⁶⁾ bewirken kann, machte Henry¹⁷⁾ für das sehr gut trypanocide 4,4'-Diamidino- α -methylstilben den Vorschlag, durch Ringschluß zum 6-Amidino-2-(4-amidinophenyl)inden die trans-Form festzulegen.

Diese Idee wurde 1970 von Dann u. Mitarb. wieder aufgegriffen, indem die trans-Form des Stilbamidins durch Ringschluß über eine Schwe-

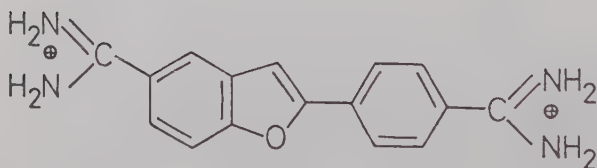
FORMELÜBERSICHT 2



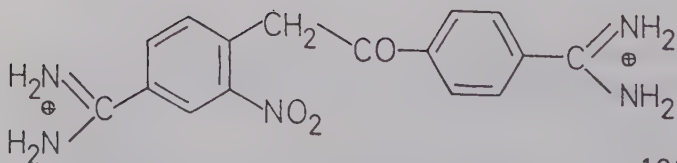
98/202



102/198



150/49



192/208

felbrücke zum 6-Amidino-2-(4-amidinophenyl) thionaphthen ²⁷⁾, 98/202, fixiert wurde (Formelübersicht 2).

Es entstand so eine Verbindung mit starker trypanocider Wirkung gegen T. gambiense, aber geringer Wirksamkeit gegen T. congolense ²⁷⁾.

Der Ersatz von -S- durch -O- und -NH- ergab ebenfalls ausgezeichnet trypanocide Substanzen mit im Falle des 5-Amidino-2-(4-amidinophenyl)-benzofuran, 150/49, hoher Wirksamkeit gegen T. rhodesiense und T. gambiense und im Falle des 6-Amidino-2-(4-amidinophenyl)indol, 102/198, mit gleich guter Wirksamkeit gegen T. congolense ²⁹⁾ (Formelübersicht 2).

Im gleichen Arbeitskreis wurden zahlreiche Variationen der genannten Diamidine synthetisiert mit zum Teil ebenfalls bedeutender chemotherapeutischer Wirkung ^{28, 29, 30)}.

1. 2. Spezifität, Wirksamkeit und Toxizität der Diamidine

Trypanocide Wirksamkeit und akute Toxizität der bearbeiteten Diamidine für die Maus sind in Tab. 1 wiedergegeben.

Die akute toxische Wirkung äußert sich bei Stilbamidin ^(R) und Pentamidin ^(R) zunächst durch eine Blutdrucksenkung, bei höherer Dosierung durch Beeinflussung des Zentralnervensystems mit Stimulierung, dann Dämpfung der Atmung bis letztlich zur Atemlähmung. Die toxische Nierenschädigung zeigt sich in erhöhtem Serum-Harnstoff und Serum Rest-Stickstoff. In hohen Dosen können diese Amidine auch einen Blutzuckeranstieg verursachen.

Stilbamidin soll Histamin freisetzen, wodurch ein Teil seiner toxischen Wirkung erklärbar ist ³¹⁾.

S a t i ³²⁾ berichtet nach wiederholter Gabe von Stilbamidin mit 1/4 der maximal tolerierten Dosis beim Menschen von Trigeminasparalysen, sogar von Todesfällen.

Stilbamidinlösungen sind gegen Einwirkung von Licht nicht beständig, wobei der Wirkungsverlust mit erhöhter Toxizität verbunden ist ¹⁵⁾. Wegen der gegenüber Stilbamidin besseren Verträglichkeit wird zur Behandlung der menschlichen Trypanosomiasis heute fast ausschließlich Pentamidin eingesetzt. Bei fortgeschrittenem Stadium der Trypanosomeninfektion, mit Parasiten in der Cerebrospinalflüssigkeit, kann mit Pentamidin keine Besserung erreicht werden. Die übliche Dosierung beträgt 3 - 5 mg/kg i. m., mit der eine Prophylaxe bis zu einem halben Jahr erreicht werden kann. Zur Heilung werden 40 - 50 mg/kg, auf tägliche Dosen zu je 5 - 7 mg/kg verteilt, angewandt ^{31, 9)}.

Saunders ³²⁾ berichtet von 14 Patienten, die bis zu 65 Injektionen mit täglich 1 mg/kg Pentamidin i. m. erhielten, ohne daß Nebenwirkungen auftraten; Dosen von 2 mg/kg sollten nicht häufiger als 2 mal wöchentlich erfolgen, um Nebenerscheinungen zu vermeiden.

Pentamidin wurde wiederholt zur Behandlung von interstitieller, durch *Pneumocystis carinii* verursachter Pneumonie, in Dosen von 4 mg/kg pro Tag eingesetzt ³⁴⁾. Nach 10-12 tägiger Behandlung wurden erhöhte Blut-Harnstoff-N -Werte gefunden. Über die Nierentoxizität von Pentamidin berichten auch De Vita et al. ³⁵⁾ sowie Emmer et al. ³⁶⁾.

Wang ³⁷⁾ et al. beschreiben einen Todesfall bei der Behandlung einer *Pneumocystis carinii* - Pneumonie mit Pentamidin: Ein 3 Jahre altes Kind bekam 4 Wochen lang tägliche Dosen von 4 mg/kg verabfolgt. Es traten toxische Hautnekrosen und Azotämie auf. Bei der Autopsie wurden Nekrosen der Nierentubuli gefunden, die Untersuchung der Lunge zeigte erfolgreiche Behandlung der Pneumonie.

Bei Berenil ^(R) äußert sich die akute Toxizität zunächst in Tremor, Nystagmus und Ataxien, bei höheren Dosen kommt es zu Streckkrämpfen, Zwangsbewegungen und Erbrechen und letztlich zum Exitus. Beim Hund betrug die maximal tolerierte Dosis 20 mg/kg i. m.; ab 15 mg/kg wurden bereits Veränderungen im Gehirn beobachtet ³⁸⁾, 30-35 mg/kg führ-

ten nach 2 bis 3 Tagen zum Tod²⁰⁾. Blutdruck und Blutzucker werden durch i.m. Applikation nicht beeinflusst; beim Hund kam es nach rascher i.v. Gabe von 0.6 - 2.2 mg/kg zu kurzzeitiger Blutdrucksenkung³⁹⁾.

Beim Rind wurde eine einmalige Dosis von 8-10 mg/kg i.m. ohne Nebenwirkungen vertragen, ebenso eine Gesamtdosis von 25 mg/kg in 5 Einzeldosen innerhalb von 10 Tagen²⁰⁾. Die Injektion in die Halsmuskulatur ist beim Rind besser verträglich als in die Glutäen- oder Hosenmuskulatur; bei der üblichen Dosierung von 3,5 mg/kg, in 5-7 %iger Lösung, traten nur selten lokale Reizerscheinungen auf.

Beim Menschen verursachte eine Medikation von je 2 mg/kg i.m. an 6 aufeinanderfolgenden Tagen lediglich eine leichte, nach Absetzen der Substanz rückgängige, Albuminurie⁴⁰⁾.

Weitere Versuche zur chronischen Toxizität wurden an Mäusen, Ratten und Hunden vorgenommen. Es wurde generell eine geringe chronische Toxizität für Berenil gefunden, die wohl ihre Ursache in der schnellen Spaltung und Ausscheidung durch den Organismus hat.

Philips et al.⁴¹⁾ untersuchten die Toxizität von Samorin^(R) an Ratten, Hunden und Affen.

2.5 mg/kg i.v. töteten Ratten innerhalb von 2 Minuten durch Atemlähmung und Herzstillstand. Bei geringeren i.v. Dosen trat Blutdrucksenkung und Tremor auf. Intraperitoneal applizierte Dosen waren 10 mal weniger giftig und zeigten verzögerte Toxizität. Als Symptome traten mäßige Blutdrucksenkung, Ataxie und Dyspnoe innerhalb von 5 Minuten auf. Subcutane Injektionen bis 500 mg/kg hatten keine toxische Wirkung.

Histologische Untersuchungen zeigten in Umgebung der Injektionsstelle Nekrosen, in der Leber wurden vereinzelt nekrotische Zellen gefunden.

Aber bereits Dosierungen von 1 mg/kg i.p. verursachten in Ratten weitgehende Mastzellen-Degranulation innerhalb 20 Minuten mit signifikanter Histaminfreisetzung.

Die Substanz reicherte sich vor allem in den Mitochondrien der Leberzellen und des Tubuliepithels an.

Die akute Toxizität bei Hund und Affen war ähnlich. Bei toxischer, nicht tödlicher Dosis traten Erbrechen, Defäkation, Tränen- und Speichelfluß auf, später Ataxien und Paralysen der Extremitäten. Nach der Autopsie wurden Lebernekrosen, Nierenveränderungen und Lungenödeme gefunden.

98/202, 102/198 und 150/49 wurden an drei mit *T. congolense* infizierten Zebu-Rindern mit einer Dosierung von 5 mg/kg i.m. getestet. Bei allen drei Substanzen wurde das Verschwinden der Parasiten aus dem Blut beobachtet, aber nur mit 102/198 wurde eine Heilung erzielt, die bis Ende des Experimentes, nach 50 Tagen, anhielt⁴²⁾.

Ogada, Fink und Mbwabi⁴³⁾ berichten von den guten trypanociden Eigenschaften von 98/202 bei der Behandlung von 3 mit *T. rhodesiense* infizierten Afrikanern.

Raether und Seidenath⁴⁴⁾ berichten über den Einsatz von 98/202 bei *Macaca arctoides* nach *T. rhodesiense*-Infektion. Ein Teil der Affen war zuvor mit Pentamidin bzw. Berenil behandelt worden. 98/202 wurde erst im späteren Stadium der Infektion eingesetzt. An 2, 3 oder 4 aufeinanderfolgenden Tagen wurden je 5 mg/kg 98/202 i.m. appliziert. Es konnte in allen Fällen die Eliminierung der Parasiten aus dem Blut, bei 3 von 4 Affen auch aus dem Liquor cerebrospinalis erreicht werden. Die Substanz wurde offensichtlich gut vertragen, da ein Teil der durch das fortgeschrittene Stadium der Infektion hervorgerufenen Symptome, wie Ataxie und Appetitlosigkeit, bei der Behandlung zurückgingen.

Die Anwendung von 102/198 beim Rind mit der Dosierung von 10 mg/kg i.m. zeigte keine bedeutende Unverträglichkeit⁴⁵⁾. Für den in der Arbeit beschriebenen orientierenden Versuch mit einem Kalb kann ebenfalls die relativ gute Verträglichkeit von 102/198 mit 10 mg/kg i.m. bestätigt werden. Die Gewichtszunahme des Kalbes innerhalb 79 Tagen betrug 18 %. In beiden Fällen traten lediglich kurz nach Injektion leichte Streckkrämpfe der hinteren Extremitäten auf, die nach 2 bis 3 Stunden nachließen.

Tabelle 1: Wirksamkeit und akute Toxizität einiger Diamidine bei der Maus.

+) ED₅₀: T. rhodensiense = T. r. EATRO 1989 / T. r. HOECHST;
 T. congolense = T. c. HOECHST
 ED₈₀ = MED, CD₈₀ = MCD, LD₅ = MTD

Substanz	Trypano- soma Spezies	Wirksame Dosis (mg/kg) i. p.			Toxische Dosis (mg/kg)		
		ED ₅₀ 49)	ED ₈₀	CD ₈₀	LD ₅	LD ₅₀	LD ₅₀ s. c.
STILBAMIDIN ^R 46)47)	T. rhod.	-----	0.3	1.7	i. p. 50	i. v. 31	180
PENTAMIDIN ^R 46)47)	T. cong. T. rhod.	45.1 11.2/0.08	0.5	30.0 3.5	i. p. 50	i. v. 28	64
BERENIL ^R 20)	T. cong. T. rhod.	3.2 0.04/----	2.5 - 5.0	s. c. 2.5	s. c. 146	-----	260
SAMORIN ^R 48)	T. cong.	-----	0.005	0.1	i. p. 50	-----	260
98/202 49)	T. cong. T. rhod.	45.4 1.18/0.44	-----	-----	i. p. 60	i. p. 117	434
102/198 49)	T. cong. T. rhod.	2.4 1.14/0.44	-----	-----	i. p. 40	i. p. 66	---
150/49 49)	T. cong. T. rhod.	----- 1.14/0.27	-----	-----	i. p. 40	-----	216

1. 3. Theorien zur Wirkungsweise der Diamidine

Bereits früh wurde der Einfluß von Diamidinen auf den Kohlehydratstoffwechsel der Trypanosomen untersucht. So zeigte Undecandiamidin im anaeroben Glucoseabbau eine Verringerung der Brenztraubensäure, Stilbamidin dagegen eine Steigerung durch Hemmung der Pyruvatdecarboxylase⁵⁰⁾. Auch für Berenil vermutete Bauer⁵¹⁾ eine Blockierung des Kohlehydratstoffwechsels.

Inzwischen ist der Effekt trypanocider Diamidine auf eine Vielzahl weiterer Enzyme und Enzymsysteme untersucht worden. Zusammenfassungen der Wirkung auf Enzymsysteme der Atmung und der Glykolyse, des Proteinmetabolismus sowie des Lipid-, Nukleinsäure- und Nukleotidmetabolismus werden bei Hawking⁵²⁾ und Williamson⁵³⁾ gegeben.

In letzter Zeit wurden einige Diamidine, so auch Pentamidin, als starke Inhibitoren spezieller, Lysin- und Arginin-spezifischer Serin-Proteinasen erkannt. Ausführlich untersucht wurde die Hemmwirkung auf Trypsin, Enterokinase, Kallikrein, Plasmin und Thrombin von Geratz und Mitarbeitern^{54,55,56,57)} teils auch von Markwardt und Mitarbeitern⁵⁸⁾. Ein Vergleich der trypanociden Wirkung der Diamidine mit der Proteinase-Hemmwirkung ergab jedoch bisher keine eindeutige Korrelation.

Bei fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigte sich für Stilbamidin, Berenil und 102/198 eine spezifische Anreicherung im Parasiten.

Für Stilbamidin wird eine Anreicherung um den Faktor 1400 berichtet⁵⁹⁾; bei einem Stilbamidin-resistenten *T. rhodesiense* -Stamm war dieser nur etwa halb so groß wie bei einem empfindlichen⁶⁰⁾. Die Anreicherung erfolgt im Kinetoplasten und in einigen Granula des Cytoplasmas, nicht im Zellkern und im Flagellum⁵²⁾. Der Anteil an Adenin (A) und Thymin (T) in der Kinetoplasten-DNA ist höher als in der Zellkern-DNA. Von Berenil und 102/198 ist die hohe Affinität für A-T-reiche DNA jedoch bekannt^{61,62)}, wobei eine Anlagerung an die DNA, offensichtlich aber keine Interkalation, erfolgt^{63,62)}. Eine Beeinflussung von Vorgängen,

bei welchen DNA als Matrix dient, wäre somit denkbar.

Für Pentamidin ist die Hemmung sowohl der DNA-Synthese als auch der Synthese von RNA, Phospholipiden und Proteinen beschrieben⁶⁴⁾. Wallis⁶⁵⁾ zeigte, daß Pentamidin Magnesium und Polyamine von den Ribosomen verdrängt, was eine Hemmung der ribosomalen Proteinsynthese erklären ließe.

Neuerdings wurden auch die Lysosomen als Chemorezeptoren für Diamidine erkannt^{66, 67)}. Stilbamidin und Samorin werden in diese aufgenommen^{66, 41)}, womit die Hemmung lysosomaler Proteasen möglich ist. Ferner sollen die Amidine eine hohe Affinität zu den Phospholipiden der Membran besitzen, wodurch die Beeinflussung der Permeabilität oder Stabilität der Lysosomenmembran denkbar ist.

Goldstone et al.⁶⁸⁾ fanden ein saures Lipoprotein in der Lysosomenmembran als weiteren möglichen Rezeptor für die kationischen Diamidine. Von Stilbamidin und Pentamidin ist die Freisetzung von Histamin aus den Lysosomen-ähnlichen Granula der Mastzellen bekannt⁶⁹⁾; Samorin zeigt ebenfalls Mastzellendegranulation⁴¹⁾.

Die bei physiologischem pH-Wert als Bis-Kationen vorliegenden Diamidine besitzen erwartungsgemäß eine starke Affinität zu anionischen bzw. elektronegativen Strukturen wie Proteinen, Nucleinsäuren, Phospholipiden, Mucopolysacchariden, Neuraminsäure und ähnlichen, woraus sich auch die Vielfalt der angedeuteten Wirkungen erklärt.

Über den letztlich trypanociden Effekt der Diamidine sowie deren Erregerspezifität herrscht noch immer Unklarheit.

Kenntnisse über die unterschiedliche Membranbeschaffenheit der verschiedenen Parasitenspezies und Wirtszellen, sowie deren Permeabilität scheinen daher besonders wichtig.

Bei *T. brucei brucei* wurde gefunden, daß die Oberfläche der lebensfähigen Parasiten, im Gegensatz zur normalen Säugerzelle, keine Neuraminsäure und Phospholipidanteile besitzt. Moribunde Parasiten mit veränderten "surface-coats" besitzen dagegen gut definierte Phospholipid-Regionen, aber keine negativen Neuraminsäurereste⁷⁰⁾.

1.4. Zusammenhang - Pharmakokinetik und Prophylaxe

Stilbamidin gewährt bei der Maus nach subkutaner Applikation von 50 mg/kg für 3 Wochen Schutz gegen eine Reinokulation mit *T. rhodesiense*. Nach Untersuchungen von Fulton und Goodwin⁷¹⁾ mußte die Blutkonzentration zu diesem Zeitpunkt extrem gering sein. Sie schlossen daraus, daß bereits sehr niedrige Konzentrationen trypanocid wirken sollten.

Raether und Mitarbeiter⁷²⁾ fanden bei Untersuchungen mit Berenil an Ratten für Pharmakokinetik und Chemoprophylaxe ebenfalls keine Korrelation: Die ausgeprägte prophylaktische Wirkung bei *T. rhodesiense*, trotz Serumkonzentrationen von unter 0,5 µg/ml, wurde durch einen Rückstrom der Substanz aus tieferen Kompartimenten erklärt, was pharmakokinetisch jedoch nicht zu beweisen war.

Eine Dosierung von 25 mg/kg Berenildiazeturat s.c. ergab einen Schutz gegen *T. rhodesiense* von 35 Tagen.

Auch Pentamidin und Samorin zeigen bei Dosierungen, die nach kurzer Zeit keine nachweisbaren Serumspiegel mehr aufrechterhalten, durchaus längere prophylaktische Wirkung. Bei 25 mg/kg Samorin reicht diese für die Maus etwa 4 Monate⁹⁾.

Nach Untersuchungen von Fink⁷³⁾ zeigten Berenil, 98/202 und 102/198 bei Dosierungen von 10 mg/kg i.p. bei der Maus eine Prophylaxe gegen *T. rhodesiense* von 13, 21 und 21 Tagen, obwohl bereits nach 1 - 2 Std. die Serumkonzentrationen unter 0,5 µg/ml liegen (vgl. Kap. 3.3.1.). Gegen *T. congolense* wurde mit Berenil eine prophylaktische Wirkung für 2 Tage, mit 102/198 für 5 Tage gefunden. Eine mögliche Erklärung ist die unterschiedliche Verteilung der Parasiten im Wirtorganismus. Während *T. congolense* und *T. vivax* ausgesprochene Blutparasiten zu sein scheinen, verteilen sich *T. rhodesiense* und *T. gambiense* nach Infektion extravasal.

Damit sind jedoch nur relative Unterschiede für die Prophylaxe der genannten Amidine zu deuten.

Generell kann für die bearbeiteten Diamidine eine hohe Anreicherung in Leber und Nieren festgestellt werden. Von da mag ein schwacher kontinuierlicher Rückstrom ins Blut erfolgen, der zwar nur niedrige Konzentrationen, jedoch hohe Halbwertszeiten für spätere, nicht mehr meßbare Eliminationsphasen, liefert.

Ferner dürfte das Gewebe in unmittelbarer Umgebung der Injektionsstelle, nach i.p., s.c. oder i.m. Applikation, ebenfalls als Depot wirken, wie dies für Samorin gesichert ist ⁴¹⁾.

Die von H a w k i n g ³¹⁾ bei in vitro-Versuchen gefundenen trypanociden Konzentrationen für Stilbamidin, Pentamidin, Berenil und Samorin mit 0.04 - 10 µg/ml zeigen ebenfalls, daß sich die prophylaktische Wirkung der Diamidine nur über eine hohe, spezifische in vivo-Anreicherung im Parasiten erklären läßt.

1.5. Absicht bzw. Ziel der eigenen Untersuchungen

Zunächst sollte eine Nachweismethode erarbeitet werden, mit der Serumspiegel, Elimination und Verteilung von Diamidinen im Organismus zu ermitteln waren.

Anhand der Pharmakokinetik von 98/202, 102/198 und 150/49 sollte untersucht werden, ob die deutliche Parasitenspezifität durch unterschiedliche Verteilungsmuster der Substanzen zu erklären sei.

Im Vergleich mit bekannten trypanociden Diamidinen sollte die prophylaktische Wirkung, mit Hilfe der Substanzkonzentrationen in Serum und Organen sowie der Eliminationshalbwertszeiten, abgeschätzt werden. Durch eine Gegenüberstellung der Pharmakokinetik bei der Maus mit orientierenden Untersuchungen an einem Kalb waren eventuelle qualitative Unterschiede zu ermitteln sowie quantitative Beziehungen aufzustellen, die klären sollten, ob die Maus als Versuchstier für eine Vorausbeurteilung der Pharmakokinetik von Diamidinen geeignet sei.

2. Nachweisverfahren

2.1. Meßmethode

2.1.1. Bisher angewandte Methoden

Im folgenden Überblick sind die Amidine Stilbamidin, Pentamidin, Berenil und Isometamidium berücksichtigt (s. Formelübersicht 1 Kap. 1.1.).

2.1.1.1. Absorptionsphotometrie

Die genannten aromatischen Amidine besitzen praktisch alle im UV-Bereich liegende, zur Photometrie geeignete Absorptionsmaxima. Fulton und Goodwin⁷¹⁾ berichteten über ein Nachweisverfahren für Stilbamidin, das dessen Absorptionsmaximum bei 329 nm, $\log \epsilon$ 4.58, benutzt, um bis zu 5 $\mu\text{g/ml}$ im Serum nachzuweisen.

Zur Bestimmung von Isometamidium wurden die Absorptionsmaxima bei 278 nm und 378 nm herangezogen. So konnten Philips et al.⁴¹⁾ im Plasma Konzentrationen bis 0.7 $\mu\text{g/ml}$ bestimmen; die Nachweisgrenze für Gewebe lag bei 3.3 $\mu\text{g/g}$, für Faeces bei 13 $\mu\text{g/g}$ mit Wiederfindungsraten von 80 - 86 %.

Dibbern⁷⁴⁾ bestimmte für Berenil anhand des Extinktionsmaximums bei 370 nm dessen Gehalt in Serum, Harn und Milch von Versuchstieren bis zu einer Konzentration von 5 $\mu\text{g/ml}$.

Für Berenil ist weiterhin die Möglichkeit zur kolorimetrischen Bestimmung nach Säurespaltung, Diazotierung und anschließender Kupplung entsprechend der Reaktion nach Bratton und Marshall, 1939, zu einem roten Azofarbstoff gegeben. Diese Methode wurde von Raether et al.⁷²⁾ aufgegriffen. Das Maximum der Farbintensität liegt bei 545 nm, die Nachweisgrenze wird mit 0.5 $\mu\text{g/ml}$ Serum angegeben.

2.1.1.2. Fluorimetrie

Stilbamidin und Isometamidium besitzen gute Fluoreszenzintensität und sind daher zur Messung ihrer Eigenfluoreszenz geeignet. Wegen der berichteten Photolabilität der Stilbamidinfluoreszenz^{16, 17)} finden jedoch häufig andere Nachweisverfahren Anwendung. Pentamidin besitzt zwar eine schwache Eigenfluoreszenz mit einem Emissionsmaximum bei 350 nm, diese ist jedoch zum Nachweis geringer Substanzmengen nicht geeignet⁷⁵⁾. Saltzman⁷⁶⁾ berichtet von einer fluorophotometrischen Bestimmung von Stilbamidin in Urin und Blut mit einer Nachweisgrenze von 1 µg/ml. Henry und Grindley⁷⁷⁾ nutzten die Fluoreszenz Stilbamidins zur Untersuchung von Blut, Wien⁷⁸⁾ und Hampton⁷⁹⁾ zur Ermittlung der Ausscheidung bei Versuchstieren. Hawking und Smiles⁸⁰⁾ untersuchten die Verteilung von Stilbamidin in Trypanosomen und Mäusen qualitativ. Philips et al.⁴¹⁾ ermittelten mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie die intrazelluläre Lokalisation von Isometamidium; ferner bestimmten sie dessen Organkonzentrationen durch Spektralphotofluorimetrie.

2.1.1.3. Isotopenmarkierung

Für die genannten Amidine wurde im allgemeinen die Markierung mit ^{14}C in der Amidinogruppe angewandt, wobei das Isotop über Cu^{14}CN auf der Stufe des Nitrilaustausches mit anschließender Umsetzung zum Amidin eingeführt wird^{81, 82, 83)}.

So berichten Fulton und Mathew⁸¹⁾ über die Verteilung von ^{14}C - Stilbamidin in Ratten, und Reid und Weaver⁸²⁾ sehr ausführlich über die Verteilung und Ausscheidung bei Mäusen. Für Pentamidin beschreiben Launey, Guillot und Jonchère⁸⁴⁾ ein Verfahren zur Bestimmung der Anreicherung und Ausscheidung bei der Maus und der Ratte, bei dem sie sowohl in der Amidinogruppe als auch in der Pentamethylen-

kette ^{14}C -markierte Substanz verwendeten. Von den zu untersuchenden Diamidinen wurde bisher nur 98/202 mittels der LSC (liquid-scintillation-counting) -Technik bestimmt ⁸³⁾.

2.1.1.4. Glyoxalmethode

Während die bisher angeführten Bestimmungsmethoden allgemeine, amidogruppenunspezifische Nachweisverfahren darstellten, ist die im folgenden beschriebene Glyoxalmethode nur für aromatische Amidine anwendbar. 1944 veröffentlichte Fuller ^{85, 86)} ein Nachweisverfahren für aromatische Amidine, das auf der Umsetzung dieser mit Glyoxal zu farbigen Produkten beruht, mit deren präparativen Darstellung und Strukturaufklärung sich besonders Ekeley und Ronzio ^{87, 88)} befaßten. Das als Derivat des Imidazolinon erkannte ⁸⁸⁾ Produkt ist jedoch instabil und daher für ein quantitatives Nachweisverfahren wenig geeignet. 1946 berichteten Jackson und Mitarbeiter ⁸⁹⁾ über eine Weiterentwicklung dieser Methode, basierend auf den Arbeiten von Williams et al. ⁸⁸⁾ sowie Ekeley und Ronzio ⁹⁰⁾, bei der durch Zusatz von Benzaldehyd im Falle des Benzamidins ein stabiles, fluoreszierendes Reaktionsprodukt, Benzoylphenyl-imidazolinon, erhalten wird. Diese Methode wurde später von Waalkes und de Vita ^{75, 34)} zur Bestimmung von Pentamidin wieder aufgegriffen und modifiziert. So konnten Konzentrationen bis 0.2 µg/ml bei Wiederfindungsraten von 80-100 % bestimmt werden. Die Messungen wurden in Lösung bei 500 nm nach Anregung bei 410 nm durchgeführt.

2. 1. 2. Eigene Bestimmungsmethoden

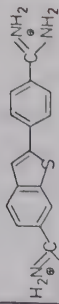
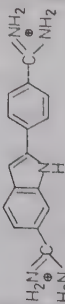
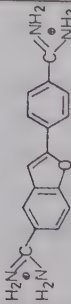
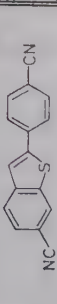
2. 1. 2. 1. Fluorimetrie

Wegen der teils sehr guten Eigenfluoreszenz der untersuchten Diamidine war bereits die geeignetste Nachweismethode festgelegt, zumal die Fluorimetrie mit zu den empfindlichsten Bestimmungsmethoden gehört. Ein großer Vorteil der Fluorimetrie besteht darin, daß die gemessene Substanz auch anhand ihres Emissionsspektrums auf ihre Identität kontrollierbar ist. Dieser Identitätsnachweis ist bei anderen sehr empfindlichen Bestimmungsmethoden wie der GC und der LSC nur durch beträchtlichen meßtechnischen Aufwand, wenn überhaupt, möglich. Durch die Kombination von dünnschichtchromatographischer Trennung mit anschließender Fluorimetrie direkt auf der Dünnschichtplatte, der in situ-Fluorimetrie, ist eine weitere Identifizierung der Substanzen, sowie die Verwendung eines inneren Standards möglich.

2. 1. 2. 2. Bestimmung der Eigenfluoreszenz mittels der Lösungsfluorimetrie

Zunächst wurden die Fluoreszenzeigenschaften der zu bestimmenden Diamidine mit Hilfe der Lösungs-Fluorimetrie ermittelt, um ihre Nachweisbarkeit anhand der spektralen Verteilung sowie der relativen Fluoreszenzausbeuten (F_{rel}) abschätzen zu können. Im Hinblick auf die gegenseitige Verwendung der Substanzen als innerer Standard sollten sie deutlich von einander getrennte Emissionsspektren jedoch etwa gleichgute Fluoreszenzausbeuten besitzen. Da die Lage der Spektren und die Fluoreszenzausbeuten einer Substanz vom Lösungsmittel bzw. vom Aggregatzustand dieser abhängig sind^{91,92}, wurden die Messungen einiger Diamidine sowohl in Wasser als auch in Dimethylformamid (DMF) durchgeführt und mit den für die in situ-Fluorimetrie gefundenen Spektren und Nachweisgrenzen verglichen (s. Kap. 2.3.).

Tabelle 2

Substanz	Lösg.- mittel	UV - Absorption				Fluoreszenz			
		$\tilde{\nu}_{\max} \cdot 10^{-3}$ (cm^{-1})	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon_{\max}$ $\cdot 10^{-3}$	ϵ_A $\cdot 10^{-3}$	d_A (nm)	$\tilde{\nu}_{\max} \cdot 10^{-3}$ (cm^{-1})	$\lambda_{\max}$ (nm)	$I_{\text{rel.}}$ $F_{\text{rel.}}$
	H ₂ O	31.1	322	30.4	27.2	0.16	24.0	417	17.2
	DMF	30.5	328	28.0	22.0	0.20	24.3	412	10.1
	H ₂ O	29.4	340	26.0	15.0	0.29	20.5	488	6.5
	DMF	28.5	351	30.5	13.3	0.32	21.4	467	86.3
	H ₂ O	31.2	321	32.5	29.0	0.15	23.0	435	173.0
	DMF	31.0	323	30.5	26.3	0.16	23.7	422	71.3
	DMF	29.3	341	34.2	12.0	0.36	23.0	435	45.9
	DMF UV / Fl. Toluol	31.2	321	34.8	29.6	0.15	26.1	383	11.6
	DMF UV / Fl. Toluol	28.5	351	19.0	10.1	0.43	23.4	427	77.4
	DMF UV / Fl. Toluol	28.5	351	19.0	10.1	0.43	23.4	427	77.4

$\epsilon_A = \epsilon$ bei $\tilde{\nu} 32000 \text{ cm}^{-1}$; $d_A = \text{mittl. Eindringtiefe des Anregungslichtes bei Leistungsabfall auf } 1/e$.

Abbildung 1 : UV - Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von 98/202

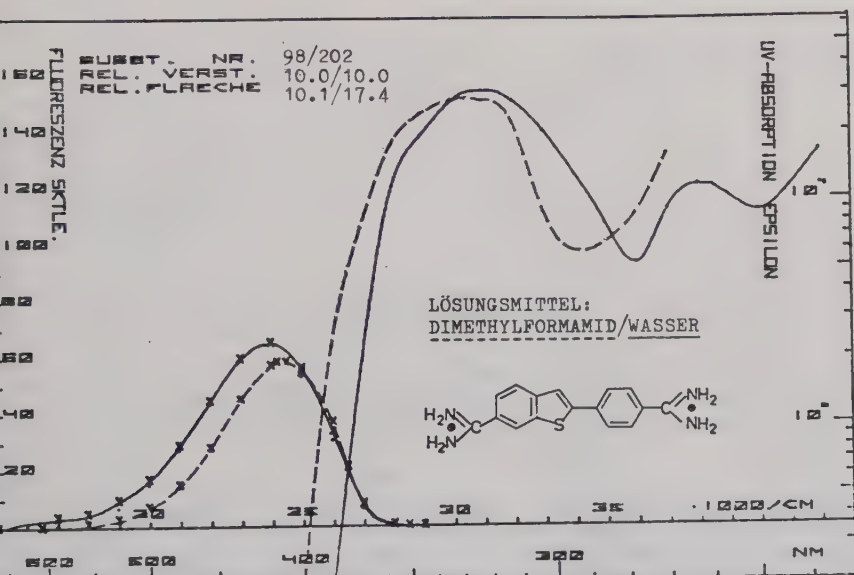


Abbildung 2 : UV - Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von 102/198

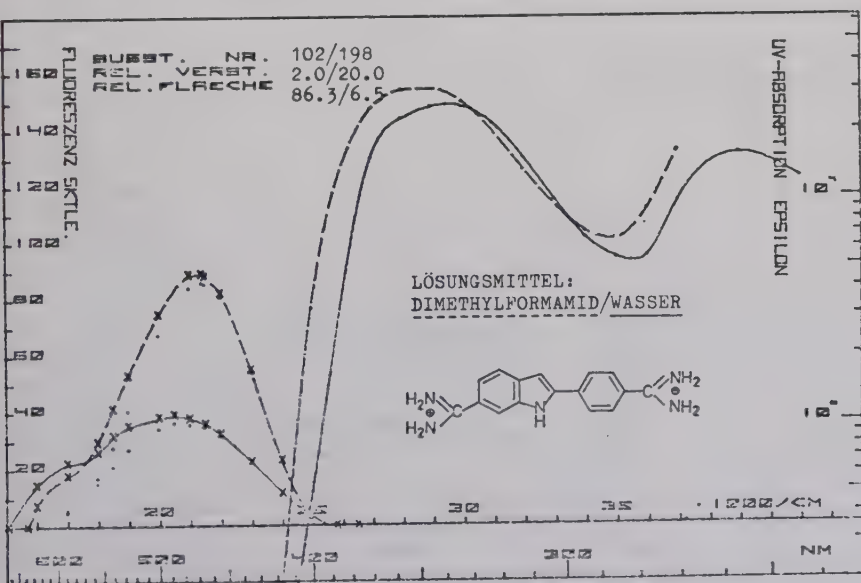


Abbildung 3 : UV - Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von 150/49

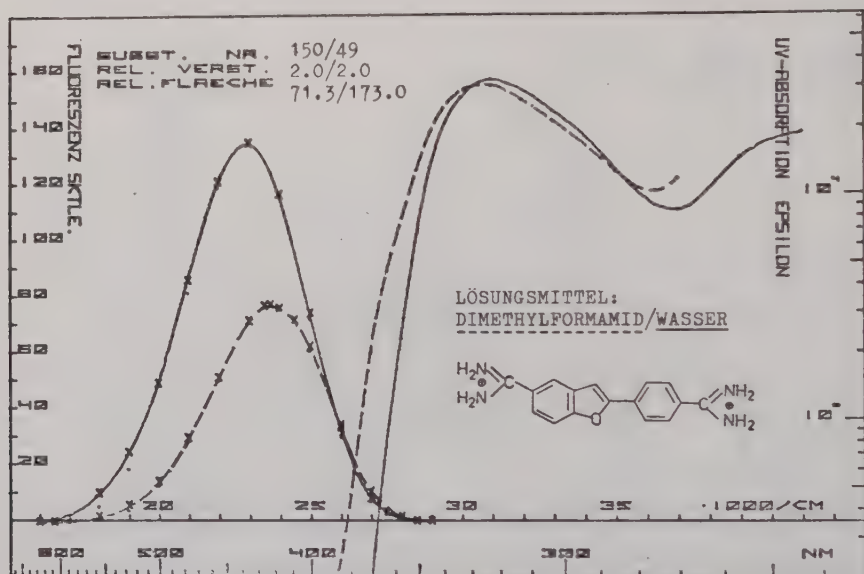
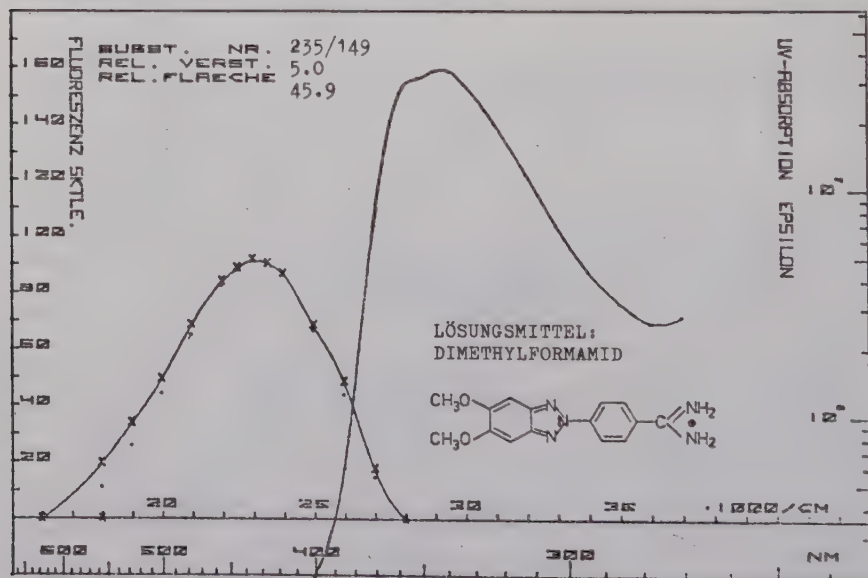


Abbildung 4 : UV - Absorptions- und Fluoreszenzspektrum von 235/149



Während 98/202 sowohl in Wasser als auch in DMF ähnliche Spektren und relative Fluoreszenzausbeuten aufweist, ist der Lösungsmiteleinfluß bei 150/49, vor allem aber bei 102/198, beträchtlich. So betrug die, bei gleicher Anregung auf 2.5-Diphenyl-oxazol (POP), $F_{\text{rel}} = 100\%$, bezogene Fluoreszenzausbeute von 150/49 in DMF 71%, in Wasser jedoch 173%.

102/198 zeigt ein gegensätzliches Verhalten: in DMF beträgt die rel. Fluoreszenzausbeute 86%, in Wasser sinkt sie auf 6,5% (s. Abb. 1-3 und Tab. 2). Offensichtlich stellt Wasser für die Fluorimetrie von 102/198 kein geeignetes Lösungsmittel dar (vgl. auch Kap. 5.2.2.).

Der Einfluß der Lösungsmittel auf die Absorption ist erwartungsgemäß gering.

Die mit der Lösungsmittel-Fluorimetrie in DMF gewonnenen Daten besaßen gute relative Aussagekraft auch im Hinblick auf die letztlich angewandte in situ-Fluorimetrie. Zur Bestimmung der Spektren und Fluoreszenzausbeuten von 235/149 wurde DMF, im Falle der Dinitrile DMF bzw. Toluol benutzt (s. Tab. 2).

2.1.2.3. Fluoreszenz nach chemischer Umwandlung

2.1.2.3.1. Oxidation von 98/202 zum Sulfon

Die Oxidation des 2-Phenyl-thionaphthen zum 2-Phenyl-thionaphthen-1,1-dioxid ist sowohl für den Grundkörper als auch für zahlreiche Derivate mit einer deutlichen Steigerung der Fluoreszenzausbeute verbunden⁹³⁾. Ein Vergleich von 6-Cyano-2-(4-cyanophenyl) thionaphthen mit 6-Cyano-2-(4-cyanophenyl) thionaphthen-1,1-dioxid zeigt für letzteres ebenfalls eine deutlich höhere rel. Fluoreszenzausbeute (s. Abb. 5 u. Tab. 2). Für die aus den beiden Nitrilen hergestellten Diamidine gilt ähnliches.

Daher wurde versucht, diese Oxidation zum Sulfon für die analytische Bestimmung von 98/202 anzuwenden, d.h., die Oxidation erst auf der Stufe des Diamidins durchzuführen und zwar mit Oxidationsmitteln, die das

spätere Nachweisverfahren unbeeinflusst ließen.

Dazu sollte zunächst im präparativen Maßstab aus 6-Amidino-2-(4-amidino-phenyl) thionaphthen dessen Sulfon durch Oxidation mit Wasserstoffperoxid in Eisessig gemäß der für das Dinitril beschriebenen⁹⁴⁾ Methode hergestellt werden. Während im Vorversuch die Oxidation des Dinitrils mit guter Ausbeute DC-reines Sulfon lieferte, ergab die Oxidation der Diamidiniumverbindung auch nach Variation der Reaktionsbedingungen⁹⁵⁾ stets DC-unreines Produkt. Außer dem gewünschten Sulfon war im DC noch Ausgangsprodukt, sowie ein weiterer ebenfalls im UV blau fluoreszierender Substanzfleck vorhanden. Zur Identifizierung wurden 6-Carboxy-2-(4-carboxyphenyl) thionaphthen⁹⁶⁾ und das daraus dargestellte Diamid (Kap. 5.1.2.) herangezogen. Nach DC-Vergleich besaß das Nebenprodukt den RF-Wert des Säureamides; die entsprechende Dicarbonsäure konnte nicht nachgewiesen werden.

Im analytischen Maßstab erfolgte die Oxidation von 98/202 mit Wasserstoffperoxid / Eisessig verschiedener Konzentration oder mit Kaliumpermanganatlösung sowohl in wäßriger Lösung als auch direkt auf der Dünnschichtplatte bei Substanzkonzentrationen von 1 - 10 µg/ml bzw. 20 µg/Fleck. Die Oxidation der auf der Kieselgelschicht absorbierten Substanz erfolgte durch Auftragen von Eisessig und verschiedener Mengen 30%igen Wasserstoffperoxids mit anschließendem Erhitzen der DC-Platte auf 100°C.

Im Falle der Oxidation in wäßriger Lösung ergab die darauffolgende Fluoreszenzmessung keine Intensitätssteigerung; es erfolgte offensichtlich keine Oxidation zum Sulfon.

Bei Oxidation auf der Dünnschichtplatte wurde nach Eluieren der Sorptionsschicht bei der anschließenden Fluoreszenzmessung zwar eine Intensitätssteigerung gegenüber 98/202 erhalten, die Fluoreszenz war aber instabil und nahm während der Messung ständig ab.

Die qualitative DC-Auswertung dieser Oxidationsversuche ergab 3-4 im UV blau fluoreszierende Substanzflecke, von denen 3 anhand der hRF-Werte dem Sulfon, der Ausgangssubstanz und dessen Säureamid zuzuord-

nen waren. Die präparativen und analytischen Oxidationsversuche von 98/202 brachten folgende Erkenntnisse:

Die Substitution des 2-Phenyl-thionaphthens durch die Amidiniumgruppe erschwert die Oxidation zum Sulfon. Offensichtlich beeinflußt, verglichen mit der Cyano-Gruppe, die noch stärker elektronenanziehende Wirkung der Amidinium-Gruppe die Elektronendichte am Schwefel derart, daß die Bindung seiner freien Elektronen an den Sauerstoff stark behindert ist.

Weiter deutete sich an, daß die Oxidation in wäßrigem Milieu zurückgedrängt wird. Wegen der starken Photolabilität des Sulfons ist dessen fluorimetrische Bestimmung unsicher.

Es mußte daher die geringere Fluoreszenzintensität und damit schlechtere Nachweisbarkeit des 98/202 in Kauf genommen, und dessen Bestimmung über die Eigenfluoreszenz durchgeführt werden.

2.1.2.3.2. Versuch der Umwandlung von Berenil zu fluoreszierendem 2-Phenyl-benztriazol

Die für Berenil in Kap. 2.1.1.1. beschriebene Nachweismethode ist unbefriedigend, da sie einerseits nicht den Nachweis des intakten Moleküls, andererseits eine ungenügende Nachweisgrenze liefert. Gerade aber für Berenil wäre eine empfindliche Nachweismethode wünschenswert, da es das letzte auf den Markt befindliche, gut wirksame Präparat gegen Trypanosoma congolense darstellt und damit eine wichtige Vergleichssubstanz für 102/198 ist.

Bei Chromatographieversuchen mit Berenil wurde beobachtet, daß bei längerem Stehenlassen einer an Kieselgel absorbierten Berenilprobe an der Laborluft nach Entwickeln der Platte in Isopropanol-Eisessig-Wasser, 6:2:2, zusätzlich ein blau fluoreszierender Fleck auftrat.

Bei UV-mikroskopischen Untersuchungen an Trypanosoma brucei, aus mit Berenil behandelten Ratten stammend, beobachteten Newton und Le Page⁶¹⁾ im Nukleus und im Kinetoplast eine brillante, blaue Fluoreszenz, die auch von anderen bestätigt wurde^{97,98)}. Offensichtlich

entstand diese Fluoreszenz des an sich nicht fluoreszierenden Berenils oder von Folgeprodukten bei der Bindung an die DNA.

Im Zusammenhang mit den obigen dünn-schichtchromatographischen Beobachtungen kam jedoch auch die Vermutung auf, daß es sich eventuell um ein Umwandlungsprodukt des chemisch sehr instabilen Berenil gehandelt haben könnte. Berenil lagert sich bekanntlich ⁹⁹⁾ im Laufe der Zeit zumindest teilweise in die entsprechende o-Amino-azoverbindung um, verbunden mit einer Farbvertiefung. Die Umwandlung von aromatischen Diazoamino-Verbindungen zu o-Aminoazofarbstoffen ^{100, 101, 102)} sowie die Möglichkeit, diese zu den entsprechenden Benztriazolen ringzuschließen, ist vielfach beschrieben ^{103, 104)}. Für Berenil wäre so die Bildung des gut fluoreszierenden 5-Amidino-2-(4-amidinophenyl) benztriazol denkbar.

Die Identifizierung des oben genannten, bei der DC von Berenil aufgetretenen Fluoreszenzproduktes mit Hilfe der DC sowie der UV-Spektrophotometrie gelang nicht; es bestand keine Identität mit dem als Vergleich herangezogenen 5-Amidino-2-(4-amidinophenyl) benztriazol ¹⁰⁵⁾ sowie 4,4'-Diamidino-biphenyl.

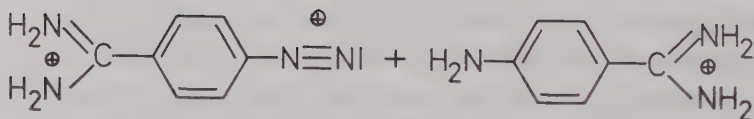
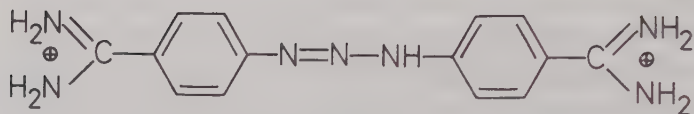
Für analytische Zwecke sollte der angedeutete Reaktionsweg jedoch verwendbar sein. Dadurch wäre, im Zusammenhang mit einer geeigneten DC-Trennung, für Berenil ein spezifischer und empfindlicher Nachweis möglich. Folgender analytischer Reaktionsweg sollte also zunächst verwirklicht werden:

Spaltung von Berenil durch eine starke Mineralsäure zu 4-Amino-benzamidin (II) und 4-Amidino-phenyldiazoniumsalz (I), Rückkoppelung der Komponenten bei pH 3-5 zum o-Amino-azofarbstoff, 2-Amino-4,4'-diamidino-azobenzol (III) und oxidativer Ringschluß zum fluoreszierenden Benztriazol, 5-Amidino-2-(4-amidinophenyl) benztriazol (IV) (s. Formelschema 1).

Als Oxidationsmittel für den Ringschluß werden Kupfer(II) salze, Hypohalogenite, Wasserstoffperoxid mit und ohne Kupfer(II)zusatz, Kaliumpermanganat und Chromsäure beschrieben.

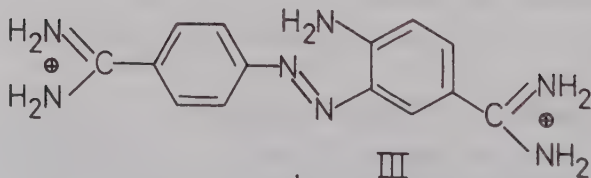
Für wasserunlösliche o-Amino-azoverbindungen bewährte sich die Ver-

FORMELSCHEMA 1

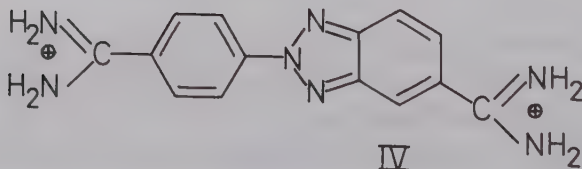


I

II



III



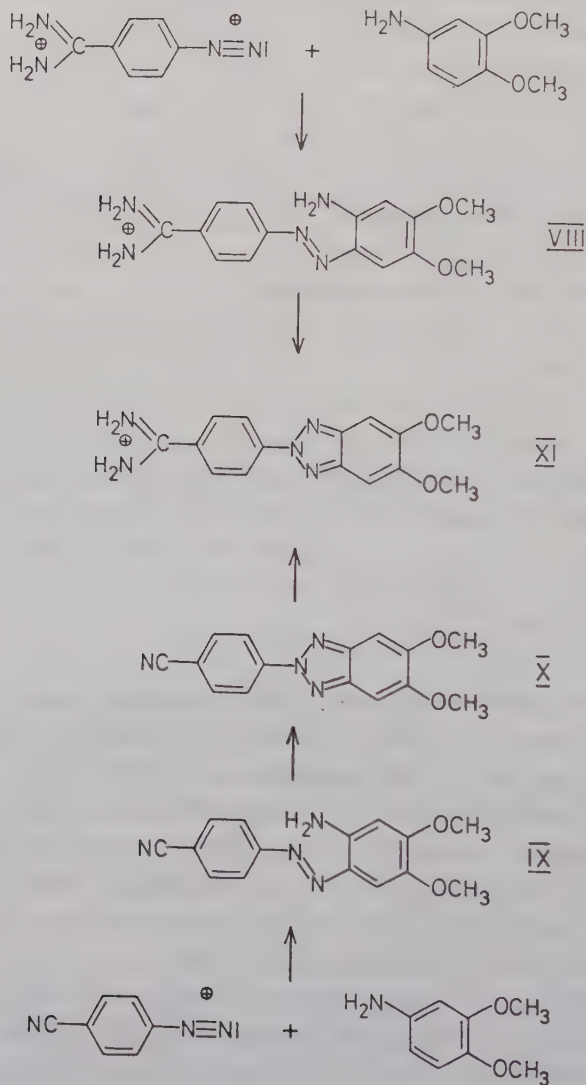
IV

wendung der 5- 6fach molaren Menge Kupfer(II)acetat in Pyridin¹⁰⁶⁾, für wasserlösliche Kupfer(II)salze in ammoniakalischem oder alkalischem, wäßrigen Medium, sowie Wasser-Pyridin-Gemische¹⁰⁷⁾. Wegen der Hydrolyseempfindlichkeit der Amidino-Gruppe in alkalischen, wäßrigen Lösungen wurde in Pyridin, bzw. Pyridin-Methanol-Gemischen gearbeitet, mit Kupfer(II)acetat als Oxidationsmittel. Obwohl eine Entfärbung der Azofarbstofflösung eintrat, gelang der oxidative Ringschluß zum gewünschten fluoreszierenden Benztriazol weder im präparativen noch im analytischen Maßstab zufriedenstellend. Bei der DC-Überwachung des Reaktionsverlaufes konnte nur ganz wenig fluoreszierendes Produkt bei sehr vielen Nebenprodukten erkannt werden. Während der Ringschluß bei o-Amino-azoverbindungen mit Substituenten 1. Ordnung glatt verläuft (s. auch später), scheint auch hier (vgl. Kap. 2.1.2.3.1.) die Amidinium-Gruppe den oxidativen Ringschluß zu behindern. Für o-Aminoazoverbindungen, die durch Kupplung von 4-Nitro-phenyl-diazoniumsalz mit aromatischen Aminen entstanden waren, wird statt des oxidativen Ringschlusses mit H_2O_2 und Kupfer(II)salz zum Triazol eine "oxidative Kupferung" beschrieben¹⁰⁸⁾.

Es wurde daher ein anderer Reaktionsweg zum Nachweis von Berenil untersucht (Formelschema 2), bei dem, nach erfolgter Spaltung der Triazenbrücke, 4-Aminoveratrol als Kupplungskomponente verwendet wurde, und der letztlich ebenfalls zu einem fluoreszierenden Produkt, 2-(4-Amidinophenyl)-4,5-dimethoxy-benztriazol (XI), führen sollte. Bei der Kupplung mit 4-Amino-veratrol war einerseits ein einheitliches Produkt zu erwarten, andererseits sollte der oxidative Ringschluß wegen der Donatoreigenschaft der Methoxy-Gruppen erleichtert sein.

Um die Verwendbarkeit von XI zur Fluorimetrie zu ermitteln, wurde zunächst dessen Synthese im präparativen Maßstab durchgeführt, und anschließend Fluoreszenzausbeute und Nachweisgrenze bestimmt. Wie aus Formelschema 2 ersichtlich, war der Ringschluß entweder bereits auf der Stufe des Nitrils (IX), oder erst auf der des Amidins durchzuführen.

FORMELSCHEMA 2



Wegen der einfacheren Reinigung des Ringschlußproduktes wurde zur präparativen Darstellung der 1. Weg beschritten.

Das so dargestellte 2-(4-Amidinophenyl)-4,5-dimethoxy-benzotriazol (XI) besaß eine auf POP ($F_{\text{rel.}} = 100\%$) bezogene relative Fluoreszenzausbeute 45,9 % (s. Abb. 4 u. Tab. 2) und eine praktische Nachweisgrenze für die in situ-Fluorimetrie von 2 ng pro Fleck.

Im analytischen Reaktionsweg mußte der oxidative Ringschluß jedoch auf der Stufe des 4'-Amidino-2-amino-4,5-dimethoxy-azobenzol (VIII) durchgeführt werden. Dieses war durch Kupplung von 4-Amidino-phenyldiazoniumhydrochlorid mit 4-Amino-veratrol bei pH 3-5 glatt darzustellen. Der Ringschluß konnte in methanolischer Pyridinlösung, in Methanol allein, aber auch in Wasser unter Zusatz eines Überschusses Kupfer (II) acetat durch Erhitzen erfolgen. Ein Vergleich der Reaktionszeiten des Ringschlusses für das Nitril (IX) mit der des Amidins (VIII) zeigte, daß auch hier die Cyano-Gruppe weniger hinderlich war als die Amidino-Gruppe. Mit Wasserstoffperoxid gelang der Ringschluß auch bei längerem Erhitzen nicht.

Bei der DC des Benzotriazols (XI) sowie bei der Fluorimetrie störte aber der hohe Kupfer (II) Salzgehalt und mußte erst aufwendig beseitigt werden. Dies gelang z. B. durch Zwischenschalten einer basischen Aluminiumoxid-Bande auf der Dünnschicht, die bei der Entwicklung das Kupfer zurückhielt.

Es konnte so zwar die gewünschte Nachweismethode verwirklicht werden, wegen der vielen Reaktionsschritte sowie der nötigen Kupferabtrennung war die Nachweisgrenze und die Reproduzierbarkeit aber nicht mehr zufriedenstellend. Weiterhin erschwerte die geringe Wasserlöslichkeit von 4'-Amidino-2-amino-4,5-dimethoxy-azobenzol-hydrochlorid eine stärkere Anreicherung.

Die Bestimmung von Berenil in Mäuseserum erfolgte daher wie bei Raether et al.⁷²⁾ beschrieben nach der Methode von Bratton und Marshall.

2.2. Chromatographie von Diamidinen

2.2.1. Wahl des Chromatographieverfahrens

Zur einfachen und wirksamen Auftrennung von Inhaltsstoffen gerade organischer Art bieten sich vor allem chromatographische Verfahren an, wie die Papierchromatographie (PC), die Gaschromatographie (GC), die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) und die Dünnschichtchromatographie (DC) incl. der HPDC (High Performance-DC).

Für Stilbamidin wird eine papierchromatographische Methode mit dem Fließmittel Pyridin-Isoamylalkohol-Wasser, 7:7:6, beschrieben, die eine Trennung von dementsprechenden Mono- und Diamidin erlaubt ⁸¹⁾.

Studien zum Pentamidinnachweis aus Urin und Organextrakten wurden mittels der DC und dem Fließmittelsystem Butanol-Eisessig-Wasser, 6:2:2, durchgeführt ⁷⁵⁾.

Zur quantitativen Bestimmung der vorliegenden Diamidine dürften nur die HPLC und die DC geeignet sein. Gegenüber der bezüglich Probendurchsatz, Empfindlichkeit und Trennleistung besonders leistungsfähigen und vollautomatisierbaren HPLC hat die herkömmliche DC dennoch auch Vorteile, wie die der größeren Detektionsmöglichkeiten, der einfacheren Überschaubarkeit und damit einfacheren Fehlersuche und nicht zuletzt der unproblematischen Handhabung. Eine deutliche Aufwertung erhielt die DC durch Entwicklung der HPDC in jüngster Zeit. Gerade im Hinblick auf die anschließende in situ-Auswertung sowie auf die Erkennung etwaiger Metaboliten erschien die DC besonders geeignet. Die bisher bekannten DC-Entwicklungssysteme für Diamidine waren im vorliegenden Fall jedoch nicht geeignet. Erst das in Kap. 2.2.3. beschriebene System ermöglichte sowohl die Verwendung von inneren Standards als auch direktes Auftragen von Harn und Serum ohne vorherige Eiweißfällung.

2.2.2. Arbeitsweise mit innerem Standard

Die Methode der Analysenauswertung mit innerem Standard bei chromatographischen Verfahren wird hauptsächlich bei der GC und der HPLC angewandt, ist aber auch bei der in situ-DC möglich. Die Verwendung eines inneren Standards bedeutet zwar zusätzliche Anstrengungen bei Entwicklung des Verfahrens sowie doppelten meßtechnischen Aufwand, gewährleistet dafür aber auch exakte Ergebnisse besonders bei der Untersuchung organischer Proben, da der innere Standard die gleichen Aufarbeitungsschritte wie die zu bestimmende Substanz durchläuft. Die beim Pipettieren organischer Phasen während des Extraktions- und Anreicherungs Vorganges unvermeidlichen volumetrischen Fehler, sowie Fehler bei der Auftragechnik auf die DC-Platte, bleiben so ohne Einfluß auf das Analysenergebnis.

Der innere Standard mußte bezüglich der zu untersuchenden Substanz folgende Anforderungen erfüllen:

- 1) Möglichst gleiche Struktur und funktionelle Gruppen und damit analoges Verteilungsverhalten! (pK -Werte, K_v).
- 2) Ähnliches chromatographisches Verhalten, aber deutliche Trennung!
- 3) Ähnliche meßtechnische Eigenschaften mit möglicher Differenzierung!
- 4) Etwa gleiche Nachweisbarkeit wie die gesuchte Substanz.
- 5) Chemische und physikalische Stabilität im Rahmen der Analysenmethode (pH , photostabil).

Der Idealfall wäre gegeben, wenn zwei zu untersuchende Substanzen gegenseitig als innerer Standard zu verwenden wären.

Wegen der bekannten Analogie der untersuchten Diamidine in einigen der geforderten Punkte, z. B. pK -Werte¹⁰⁹⁾, Chromatographierbarkeit, Fluoreszenzeigenschaften und pH -Verhalten, mußte nur noch ein Chro-

matographiesystem entwickelt werden, das eine Trennung ermöglichte.
Zur Berechnung mit Hilfe des inneren Standards s. Kap. 6.6.

2.2.3. Wahl des DC - Systems

Bei der Suche nach einem geeigneten System für die dünnenschichtchromatographische Trennung der Diamidine standen folgende Überlegungen im Vordergrund:

- 1) Das System sollte für alle zu untersuchenden Substanzen geeignet sein.
- 2) Es mußte eine deutliche Trennung von Substanz und innerem Standard liefern.
- 3) Die Amidine sollten als Salze, nicht als Basen entwickelt werden.
- 4) Direktes Auftragen von Serum und Harn sollte möglich sein.

Ferner sollten sich hRF-Werte von 30-70 ergeben, um Meßfehler durch unspezifische Fluoreszenzen am Start und an der Fließmittelfront auszuschließen. Die Substanzflecken sollten nicht zu weit im oberen hRF-Bereich liegen, da der Fleckdurchmesser mit zunehmendem hRF-Wert wächst und damit die Substanzkonzentration pro Flächeneinheit geringer wird. Je kleiner der Fleckdurchmesser desto weniger wird das Meßsignal durch Randeffekte und "tailing" verschmiert.

2.2.3.1. Wahl des Adsorbens

Prinzipiell ließen sich die Diamidiniumverbindungen sowohl auf Aluminiumoxid-, Cellulose- und Kieselgel-schichten entwickeln. Fertigplatten mit Schichtdicken von 0,25 mm verschiedener Firmen waren jedoch wegen Auftrennung einiger Fließmittel nicht geeignet. Beschichtete Aluminiumfolien von 0,2 mm Schichtdicke waren zwar zur Trennung geeignet, jedoch nicht für das letztlich verwendete Fließmittel n-Butanol / 2 N HCl

gesättigt, da im unteren hRF-Bereich wegen Zersetzens der Trägerfolie die Adsorbensschicht ablätterte. Ferner mußten Verformungen des Chromatogrammes aus Gründen der Meßgeometrie sicher ausgeschlossen sein, was nur bei Glasplatten der Fall ist.

Als am geeignetsten erwiesen sich selbst bereitete Dünnschichtplatten mit Kieselgel HR 60 "Merck" als Sorbens mit einer Schichtdicke von 0,2 mm auf Glasplatten 200 x 200 mm und 1,25 mm Dicke. Die Schicht wurde ohne Bindemittel aufgetragen, da die Abriebfestigkeit genügend war. Wegen der geringen Schichtdicke machten sich Unebenheiten in der Schicht, z. B. auch durch Agglomerate der Kieselgelkörner, besonders bemerkbar. Die DC-Platten mußten daher unter möglichst staubfreien Arbeitsbedingungen hergestellt und sorgfältig ausgesondert werden. Die zur Fluorimetrie vor allem im unteren Nanogrammbereich verwendeten Platten wurden vor Benutzung zur Prüfung der Untergrundfluoreszenz mit dem Scanner durchgemessen, da bereits kleinste Verunreinigungen durch Textilfasern mit optischen Aufhellern, wie sie übrigens auch bei Fertigplatten vorkamen, Störpeaks bei der Ermittlung der Fluoreszenzintensitätsortskurven ergaben.

Trotz spezieller Herstellung der Adsorbenssuspension und exakter Streichtechnik mußten etwa 40 % der Platten ausgesondert werden. Zur Herstellung der Platten s. Kap. 5.3.1.

Mit den so bereiteten DC-Platten konnten noch sehr kleine Stoffmengen, mindestens 1 ng 102/198 oder 150/49 reproduzierbar bestimmt werden, da eine geringe Schichtdicke die Diffusion der Stoffe an die Oberfläche erleichtert. Die Beladbarkeit der Schicht betrug etwa 150 ng bei einem Fleckdurchmesser von 10 mm. Schichtdicken über 0,25 mm verursachten eine Auftrennung des letztlich verwendeten Fließmittels (s. Kap.

2.2.3.2.).

Beim Auftragen der Diamidine aus saurer Lösung ergaben sich sehr kleine Fleckdurchmesser am Start von 2 - 3 mm, da die Amidiniumionen direkt am Auftragepunkt vom Kieselgel stark adsorbiert wurden.

2.2.3.2. Wahl des Fließmittels

Die bisher benutzten Fließmittel zur DC-Entwicklung von Diamidinen ergaben im vorliegenden Fall zwar geeignete hRF-Werte, brachten aber keine deutliche Trennung. In Tab. 3 sind einige mögliche Fließmittel zur Chromatographie von Diamidinen angegeben.

Tabelle 3: Fließmittel zur DC von Diamidinen

Fließmittel		hRF - Werte			
		98/202	102/198	150/49	Berenil
1	n-Butanol/Eisessig/H ₂ O 6:2:2 75)	64	67	60	
2	n-Butanol/1 N HCl gesättigt	52	67	50	
3	n-Butanol/2 N HCl gesättigt	55	72	52	
4	Isopropanol/Eisessig/H ₂ O 6:2:2	42	43	40	43
5	Isopropanol/2 N HCl 96:4	32	35	33	
6	Isopropanol/Milchsäure 8:2 0,1 M	76	74	69	
7	Isopropanol/2 N HCl 90:10	65	70	60	
8	Dioxan/NH ₃ conc. 96) 4:1	35	10	30	
9	Isopropanol/H ₂ O/Eisessig 6:2:1	-	-	-	65
10	Isopropanol/H ₂ O 8:2	-	-	-	30

Erst die Verwendung von n-Butanol/2 N HCl gesättigt ermöglichte eine genügende Trennung von Substanz und innerem Standard. Ein weiterer Vorteil des Systems lag darin, Harn und Serum direkt auftragen zu können, d.h. ohne vorherige Enteiweißung oder Extraktion. Wegen der eiweißfällenden Eigenschaften der beiden Fließmittelkomponenten war nach Entwicklung des Chromatogrammes um den Startpunkt ein fluoreszieren-der Ring entsprechend der Ausdehnung der Auftrageflüssigkeit zu erkennen, der bei Leerharn oder Leerserum ebenfalls auftrat.

Für die Fließmittel 1-8 wurden selbst bereitete Kieselgel-Platten (s. Kap. 5.3.1.) verwendet, für Fließmittel 9 und 10 Aluminiumfolien CE F Cellulose der Fa. RIEDEL DE HAEN.

Der Nachteil des Systems lag jedoch in der langen Laufzeit und der schweren Abdampfbarkeit des Fließmittels. Da die Laufzeit etwa 10 Stdn. betrug, wurde meist über Nacht entwickelt. Das Fließmittel wurde im Vakuumtrockenschrank bei 20 Torr und 50°C abgedampft. Nach dem Erkalten wurde das Vakuum mit N₂ aufgefüllt und die Platten bis zur Messung unter Lichtausschluß in N₂-Atmosphäre aufbewahrt.

Der Einfluß von O₂ als Fluoreszenzlöcher ist bekannt⁹¹⁾, machte sich aber im vorliegenden Fall kaum bemerkbar, wie Messungen von 50 ng Diamidin ergaben, wobei die Dünnschichtplatte 30 Min. sowie 3 Stdn. der Laborluft unter Lichtausschluß ausgesetzt wurde. Der Einfluß von UV-Licht jedoch war je nach Energie beträchtlich wie in Kap. 2.3.6. beschrieben.

2.3. In situ - Fluorimetrie

2.3.1. Vorteile der Methode

Die in situ - Spektrofluorimetrie wurde von Seiler et al.¹¹⁰⁾, Sawicki et al.¹¹¹⁾, Klaus¹¹²⁾ sowie Stahl und Jork¹¹³⁾ eingeführt und eingehend untersucht. Sie ist der indirekten Lösungsfluorimetrie aus verschiedenen Gründen überlegen. So entfällt das aufwendige Auskratzen und Eluieren der Sorptionsschicht und die damit verbundene Gefahr, Substanz zu verlieren. Der große Vorteil der in situ-Methode besteht aber in der hohen Substanzkonzentration in der Dünnschicht. So liegt der Arbeitsbereich normalerweise im Nanogramm-Bereich, die Nachweisgrenze bei 10^{-11} g¹¹⁴⁾. Für die Lösungsmittelfluorimetrie müßte die Substanzkonzentration pro Fleck mindestens um 1 bis 2 Zehnerpotenzen höher liegen. Eine niedrige Substanzkonzentration gewährleistet aber deutlichere Trennungen und damit sichere quantitative Auswertung.

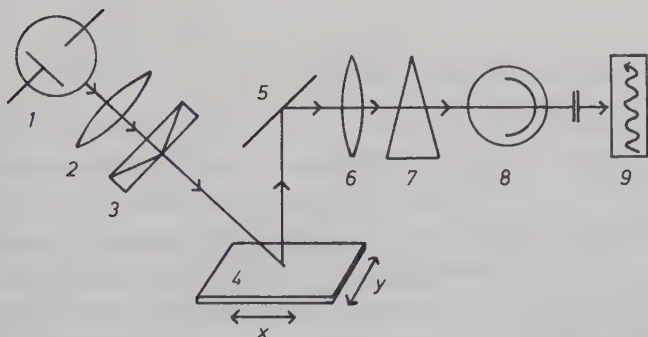
2.3.2. Meßplatzbeschreibung

Alle Messungen wurden mit dem ZEISS Chromatogramm-Spektralphotometer mit angeschlossenem Kompensationslinienschreiber durchgeführt. Für die Fluorimetrie wurde die in Abb. 6 schematisch dargestellte Geräteaufstellung gewählt, die auch zur Bestimmung der spektralen Intensitätsverteilung der Substanzen geeignet ist.

Abbildung 6 :

Chromatogramm-Spektralphotometer der Fa. ZEISS in der Meßanordnung Pr-M für Fluoreszenzmessungen.

1 = Hg-Mitteldruckbrenner, 2 + 6 = Zwischenoptik, 3 = Monochromatfilter, 4 = Kreutztisch mit DC-Platte, 5 = Umlenkspiegel, 7 = Monochromator, 8 = Empfänger, 9 = Schreiber.



Die Strahlungsquelle, ein Quecksilberbrenner mit nachgeschaltetem Monochromatfilter, beleuchtet unter einem Winkel von 45° die auf dem Kreutztisch liegende Dünnschichtplatte. Die von der Probe emittierte Fluoreszenzstrahlung gelangt über einen Spiegel in den Monochromator, wo sie spektral zerlegt wird. Das Licht des gewählten Wellenlängenbereiches gelangt zum Empfänger und liefert ein Signal, das vom angeschlossenen Kompensations-Linienschreiber registriert wird. Der Papiervorschub des Schreibers wird mit dem Motorantrieb des Kreuzzisches gekoppelt. Der gemessene Flächenausschnitt des DC wird vorteilhafterweise von einer rechteckigen Spaltblende ($4 \times 14 \text{ mm}$) begrenzt. An dieser wird das Chromatogramm und damit der Substanzfleck entlanggeführt. Man erhält so die Fluoreszenzintensitätsortskurven, deren Fläche über der Basis-

linie ein Maß für die vorliegende Substanzmenge darstellt.

Gegenüber der ebenfalls verwendeten Kreisblende bietet die Spaltblende ein höheres Ortsauflösungsvermögen, so daß sie bei eng angrenzenden Flecken vorzuziehen ist. Ferner ist wegen der kleineren Meßfläche die vom Empfänger registrierte Untergrundfluoreszenz niedriger¹¹⁵⁾.

Diese liefert aber meistens den größten Beitrag zur Unregelmäßigkeit der Nulllinie¹¹⁶⁾, so daß bei Verwendung des Meßspaltes anstelle der Kreisblende die Empfindlichkeit um etwa 1 Zehnerpotenz steigt¹¹⁵⁾.

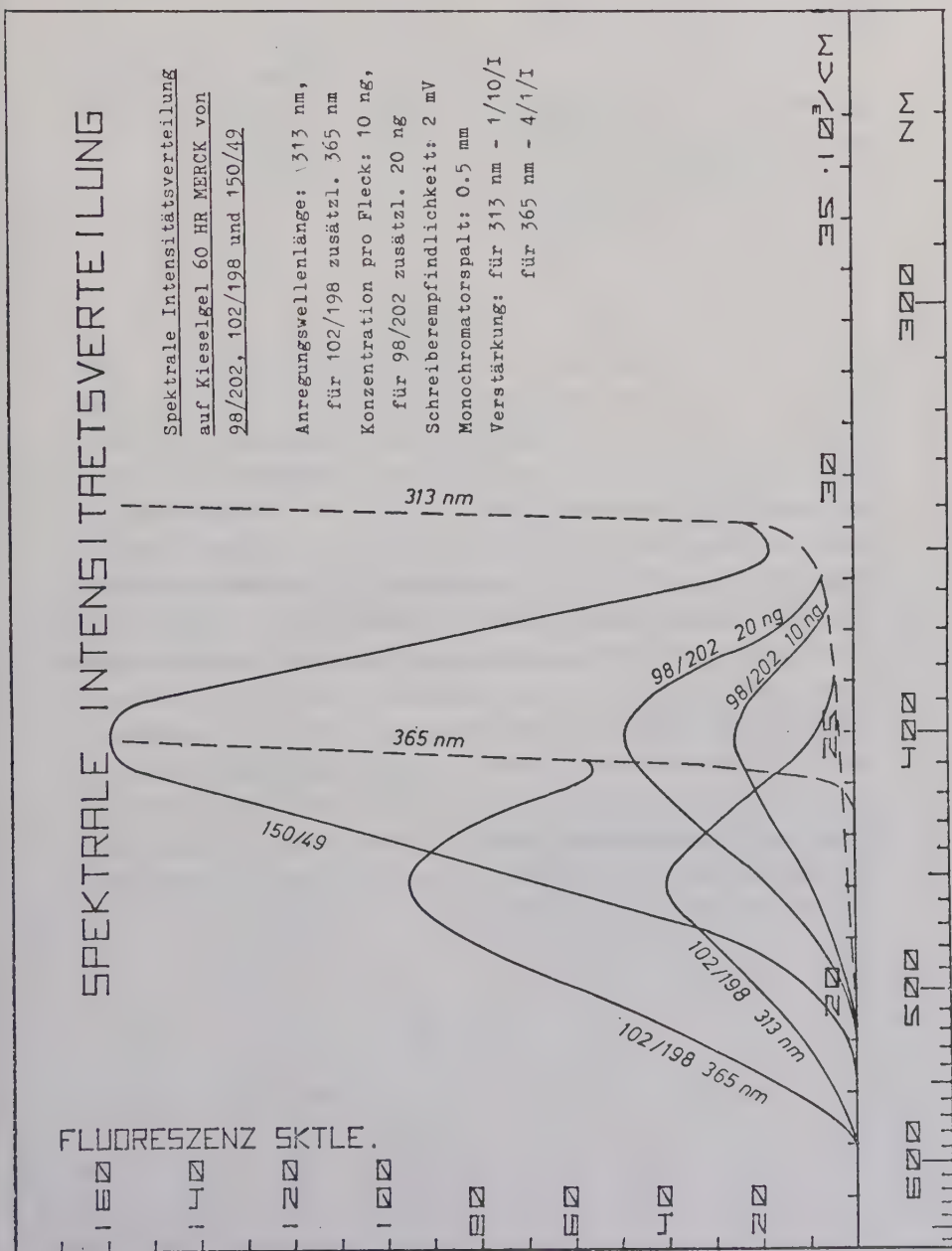
2.3.3. Spektrale Intensitätsverteilung

Wie bereits in Kap. 2.1.2.2. erwähnt, sind die bei der Bestimmung der Fluoreszenzspektren in Lösung gewonnenen Daten nicht ohne weiteres für die in situ-Fluorimetrie zu übernehmen. Daher wurden zunächst die unkorrigierten Fluoreszenzspektren oder besser die spektrale Intensitätsverteilung der auf der Kieselgelschicht absorbierten Substanzen bestimmt. Wegen des vorgegebenen Meßplatzes mußte die Anregung durch einen Quecksilberbrenner mit nachgeschalteten Monochromatfiltern erfolgen. Für die Anregung standen also in diesem Fall nur die Hg-Linien 313 nm und 365 nm zur Verfügung. Die dazwischenliegende Hg-Linie 334 nm ist wegen ihrer geringen Intensität nicht geeignet. Für alle Diamidine wurde die gleiche Konzentration pro Substanzfleck, 10 ng, gewählt. In Abb. 7 ist die spektrale Intensitätsverteilung von 98/202, 102/198 und 150/49 für die Anregung 313 nm ($\tilde{\nu}$ 32000 cm⁻¹) bei gleichen Meßdaten, sowie von 102/198 für die Anregung 365 nm ($\tilde{\nu}$ 27400 cm⁻¹) bei dem 0,4fachen der obigen Verstärkung wiedergegeben. Aus den Spektren lassen sich die für die einzelnen Substanzen geeigneten Anregungslinien sowie deren günstigster Emissionsbereich für die Messung bestimmen.

Die in Abb. 7 dargestellten, gestrichelten Linien zeigen den Beginn der Streustrahlung des anregenden Lichtes für 313 nm und 365 nm bei den gewählten Meßbedingungen.

Abbildung 7 :

Spektrale Intensitätsverteilung der Diamidine auf Kieselgel



Ferner erkennt man gut die relative Nachweisbarkeit der Diamidine. Eine Erhöhung der Nachweisgrenze für 98/202 ist zwar durch Vergrößerung des Monochromatorspaltes oder durch höhere Verstärkung möglich, wegen der damit verbundenen Steigerung der Untergrundfluoreszenz ist eine Linearität des Meßsignals jedoch nicht mehr gegeben.

2.3.4. Fluoreszenzintensitätsortskurven

Bei der gewählten Meßtechnik, unter Verwendung des Meßspaltes, erhält man die Fluoreszenzintensitätsortskurven als Maß für die Konzentration pro Substanzfleck. Da ihre Auswertung durch Planimetrieren der Fläche über der Grundlinie erfolgte, sollten möglichst Peakflächen mit einem Peakhöhen-Halbwertsbreiten-Quotienten von 2 - 10 erhalten werden. Nach Angaben von Seiler¹¹⁶⁾, Ball¹¹⁷⁾ und anderen ist unter diesen Bedingungen die Peakflächenbestimmung am genauesten möglich und relativ unabhängig von den verschiedenen manuellen Methoden. Während die Peakhöhe letztlich von der Substanzkonzentration bestimmt wird, ist die Peakbreite ohne Änderung der Linearität mit Hilfe der Papiervorschubgeschwindigkeit in weiten Grenzen variierbar. Die für die Zeichnung der in den Abb. 8, 9, 10 wiedergegebenen Intensitätsortskurven sowie für die meisten Bestimmungen gewählte Papiervorschubgeschwindigkeit betrug 120 mm/Min. Die Kurven wurden durch Abtasten des DC vom Start bis zur Fließmittelfront ermittelt; sie geben daher die hRF-Werte der Substanzen wieder.

Abbildung 8: Fluoreszenzintensitätsortskurve 98/202

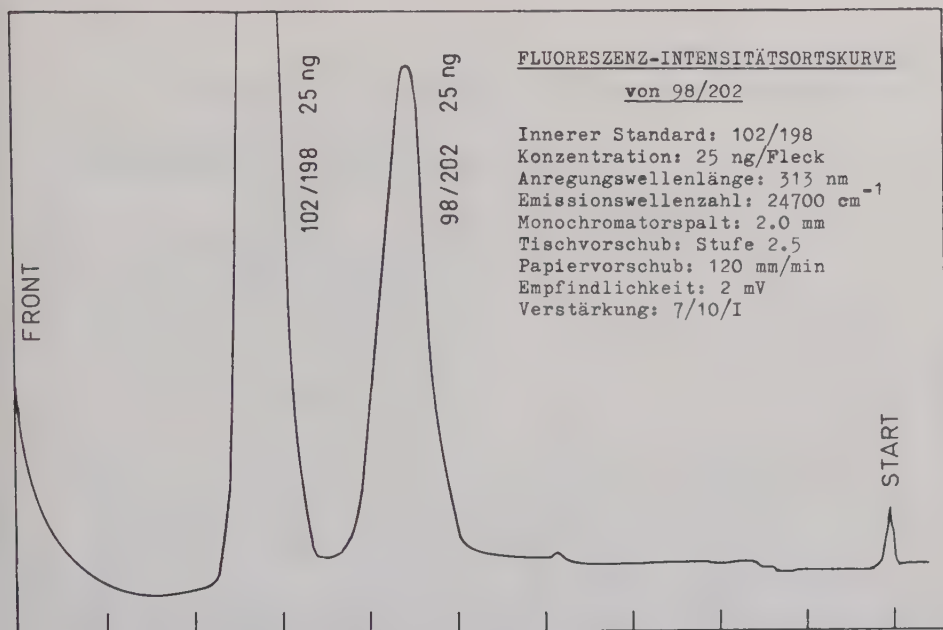


Abbildung 9: Fluoreszenzintensitätsortskurve 102/198

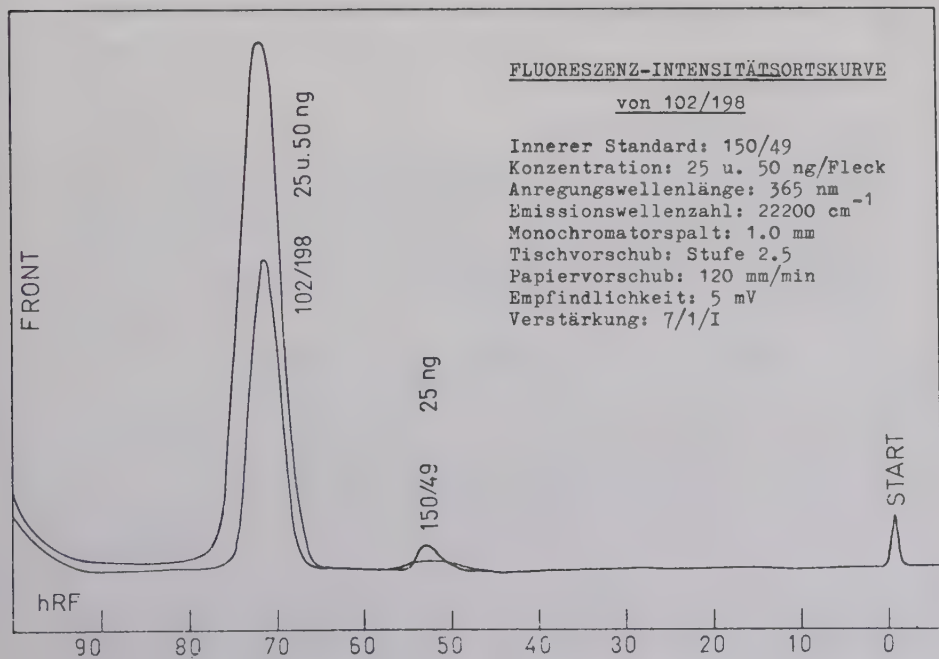
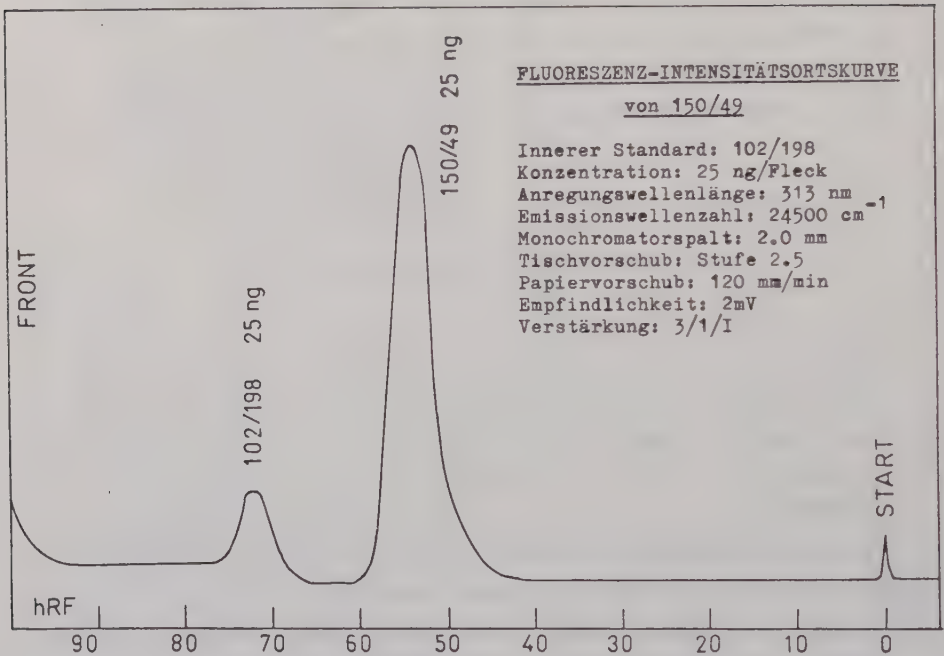


Abbildung 10 : Fluoreszenzintensitätsortskurve 150/49



2.3.5. Linearer Meßbereich

Nach einer Gleichung von Braunsberg und Osborn¹¹⁸⁾ kann im Konzentrationsbereich von $E(\lambda) \cdot c \cdot d \leq 0.05$ folgende lineare Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Konzentration der fluoreszierenden Substanz erhalten werden¹¹⁶⁾:

$$I_F(\lambda) = f(\theta) \cdot g(\lambda) \cdot I_0 \cdot Q_F \cdot E(\lambda) \cdot c \cdot d$$

$I_F(\lambda)$: Fluoreszenzintensität

$f(\theta)$: Empfängerabhängiger Geometriefaktor

$g(\lambda)$: Empfindlichkeitsfaktor des Empfängers für das Emissionslicht

I_o	:	Intensität des Erregerlichtes
Q_F	:	Quantenausbeute
$\epsilon (\lambda)$	:	molarer Extinktionskoeffizient bei der Anregungswellenlänge
c	:	molare Konzentration der fluoreszierenden Substanz
d	:	Weglänge des absorbierten Erregerlichtes in der Substanzlösung

Bei konstanten Meßbedingungen gilt dann für eine bestimmte Substanz:

$$I_F = k \cdot I_o \cdot c$$

Bei einer Konzentration, bei der kein merklicher Intensitätsverlust des eingestrahnten Lichtes durch Absorption auftritt, ist also die Fluoreszenzintensität der Substanzkonzentration direkt proportional.

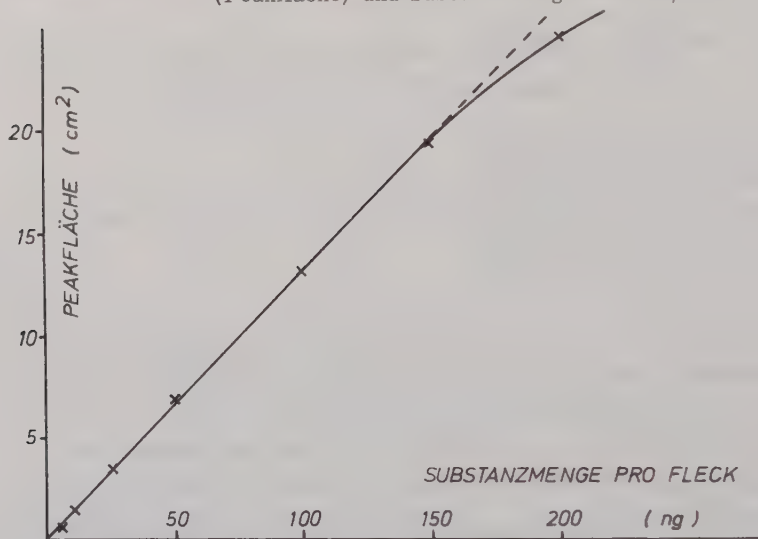
Seiler et al.¹¹⁰⁾ und Klaus¹¹²⁾ zeigten, daß diese für die Lösungsfluorimetrie aufgestellten Gleichungen auch für die in situ-Fluorimetrie gelten. Dabei ist, ebenfalls in einem Konzentrationsbereich, in dem hinreichend geringe Absorption des Erregerlichtes auftritt, die integrale Fluoreszenzintensität eines Fleckes, unabhängig von der Fleckform, der Substanzmenge direkt proportional.

Dieser Bereich der genügend geringen Konzentration wurde für jedes der zu messenden Amidine ermittelt.

Dazu wurden jeweils 10 µl entsprechend verdünnter Substanzlösungen aufgetragen und die Peakflächen der erhaltenen Intensitätsortskurven als Funktion der Substanzkonzentration pro Fleck graphisch dargestellt.

In Abb. 11 ist der lineare Meßbereich am Beispiel für 102/198 dargestellt.

Abbildung 11 : Zusammenhang zwischen Fluoreszenzintensität (Peakfläche) und Substanzmenge bei 102/198



Linearität der Beziehung war gegeben für:

98/202	bis	200 ng	bei λ_A 313 nm
102/198	bis	150 ng	bei λ_A 365 nm
150/49	bis	150 ng	bei λ_A 313 nm

Die Nachweisgrenzen betrugen bei oben genannter Anregung für 98/202 5 ng pro Fleck, für 102/198 und 150/49 je 1 ng pro Fleck.

2.3.6. Photostabilität der Diamidine

Einige Diamidine zeigen unter dem Einfluß von Licht, besonders UV-Licht, einen deutlichen Verlust an Fluoreszenzintensität^{71, 76)}.

Für eine Intensitätsminderung bei der in situ-Fluorimetrie wird unter anderem die Absorption von Luftfeuchtigkeit verantwortlich gemacht^{119, 120)}.

Auch der Einfluß von Sauerstoff auf die Fluoreszenzintensität von an Kie-

selbst adsorbierten Substanzen ist bekannt⁹¹⁾. Während eine durch die letztgenannten Einflüsse bedingte Fluoreszenzminderung durch entsprechende Techniken^{119, 121)} ausgeschaltet werden kann, muß die substanz-eigene Photolabilität in gewissen Grenzen in Kauf genommen werden.

Zur Ermittlung der Photostabilität der zu messenden Diamidine wurde ein durch die Spaltblende bestimmter Flächenausschnitt eines 10 ng bzw. 50 ng Substanzfleckes mehrere Minuten lang mit definiertem UV-Licht bestrahlt. Die pro Zeiteinheit abnehmende Fluoreszenzintensität wurde graphisch dargestellt. Der Versuch wurde sowohl mit den entsprechenden Amidinsalzen als auch mit den freien Basen durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 12 und 13 wiedergegeben.

Es ist zu erkennen, daß 102/198 als Base wie als Salz die geringste Photostabilität besitzt, wobei die Bestrahlung mit der Hg-Linie 313 nm anfangs einen stärkeren Intensitätsverlust verursacht. In allen Fällen sind die freien Basen instabiler als die Amidiniumsalze.

Bei der zur Ermittlung der Intensitätsortskurven gewählten Tischvor-schubgeschwindigkeit des scanners von 1.25 mm/sec wird ein Fleck von 10 mm Durchmesser nur etwa 8 sec durch die Spaltblende bestrahlt. Bei zweimaliger Messung mit vorherigem, kurzem Fokussieren des Flek-kes wird die Substanz also ungefähr 20 sec strahlenbelastet. Der bei die-ser Bestrahlungsdauer auftretende Intensitätsverlust ist insgesamt ge-ring, wie aus Tab. 4 ersichtlich.

Abb. 12 : Fluoreszenzintensitätsverlust der Diamidinbasen bei UV-Bestrahlung

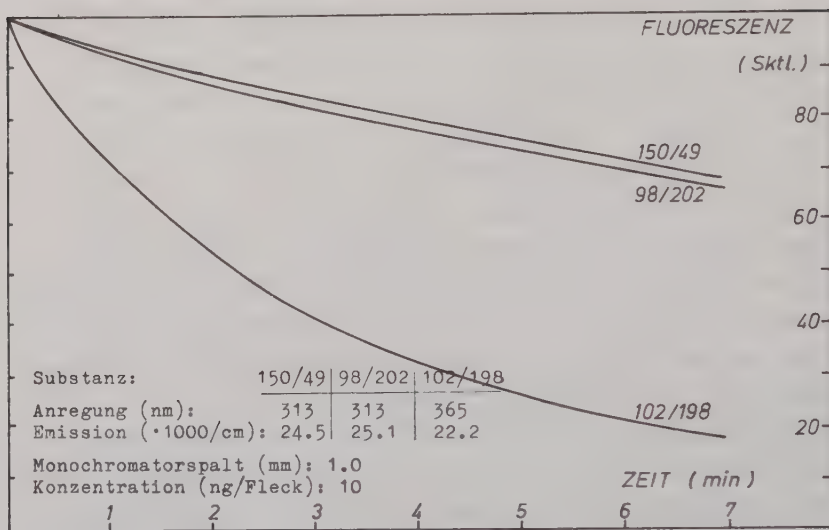


Abb. 13 : Fluoreszenzintensitätsverlust der Diamidin-hydrochloride bei UV-Bestrahlung

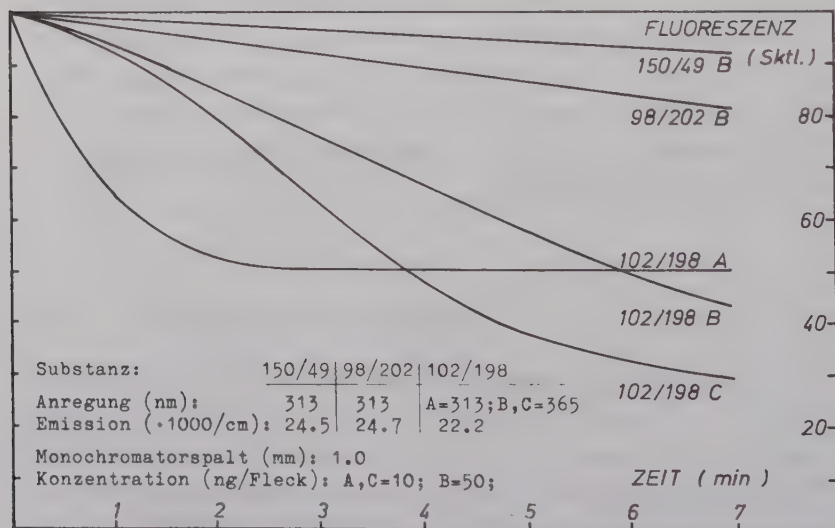


Tabelle 4: Fluoreszenzintensitätsverlust der Diamidin-hydrochloride bei 20 sec Bestrahlung mit UV-Licht unter Meßbedingungen.

Substanz	Nr.	Konz. pro Fleck (ng)	Anregung (nm)	Emission (10^3 cm^{-1})	Schreiber-Empfindlichkeit (mV)	Empfänger-Verstärkung	Intens. Verlust in 20 s (%)
98/202	B	50	313	24.7	2	1/10/I	< 1
102/198	B	50	365	22.2	10	3/ 1/I	< 2
102/198	C	10	365	22.2	5	5/ 1/I	< 2
102/198	A	10	313	22.2	2	6/10/I	~12
150/49	B	50	313	24.5	5	4/ 1/I	<1

Der Einfluß von Luftfeuchtigkeit und Sauerstoff machte sich kaum bemerkbar, da bei Chromatogrammen, die 3 Stdn. unter Lichtausschluß der Laborluft ausgesetzt waren, bei wiederholter Messung kein merklicher Intensitätsverlust festgestellt werden konnte.

Die Stabilität der Diamidine bei der gewählten Meßtechnik war demnach genügend, um die im folgenden Kapitel beschriebene zufriedenstellende Reproduzierbarkeit zu liefern.

2.3.7. Präzision der Meßmethode

Beim Schreiben der Fluoreszenzintensitätsortskurven wurde die Papier-vorschubgeschwindigkeit sowie die Empfindlichkeit des Schreibers dem Verstärkersignal möglichst derart angepaßt, daß Peakflächen von etwa 2000 mm^2 erhalten wurden.

Im vorliegenden Fall erfolgte die Peakflächenbestimmung per Hand mit Hilfe eines Planimeters, nach zweimaligem Planimetrieren der Kurvenfläche. Die 10malige Bestimmung einer Fläche vom Mittelwert ($\bar{x}$)

2220 mm² brachte eine relative Standardabweichung ($s_{rel.}$) von 0.7 %, die von $\bar{x} = 350 \text{ mm}^2$ $s_{rel.} = 1.9 \%$, Werte, die denen wie sie von P a t a k i ¹²²⁾ gefunden wurden entsprechen und nur unwesentlich unter der Präzision elektronischer Integriermethoden liegen.

Die Reproduzierbarkeit der gesamten Nachweismethode, die sowohl die Fehler der Auftragetechnik und des Meßplatzes sowie die Qualität der selbstbereiteten Dünnschichtplatten wiedergibt, wurde folgendermaßen ermittelt:

Von Lösungen mit 1 µg/ml, bzw. 5 µg/ml 102/198 sowie 1 µg/ml 98/202 in Wasser wurden 10 mal je 10 µl entsprechend 10 bzw. 50 ng Substanz auf die Dünnschichtplatte aufgetragen und anschließend chromatographiert. Das in Tab. 5 angegebene Ergebnis umfaßt den in den Versuchen üblicherweise eingehaltenen Meßbereich und ist mit den Ergebnissen anderer ^{121, 122)} für die Reproduzierbarkeit von in situ Fluoreszenzmessungen vergleichbar.

Tabelle 5: Reproduzierbarkeit der in situ-Fluoreszenzmessung ($\tilde{\nu}_A$ = Wellenzahl der Anregung $\times 10^3 \text{ cm}^{-1}$; MC = Monochromatorterspalt in mm; E = Empfindlichkeit d. Schreibers in mV; V = Verstärkungseinstellung)

Substanz Nr.	Konzentr. pro Fleck (ng)	mittlere Peak- fläche (mm ²)	$s_{rel.}$ (%)	Meßdaten				
				$\tilde{\nu}_A$	$\tilde{\nu}_E$	MC	E	V
98/202	10	1020	6.5	31.9	24.7	2.0	2	3/10/I
102/198	10	2100	2.8	27.4	22.2	1.0	2	4/10/I
102/198	50	1800	1.9	27.4	22.2	1.0	5	2/10/I

2.4. Anreicherungsverfahren

2.4.1. Wahl des Gefäßmaterials

Bei anfänglichen Versuchen zur Ermittlung des linearen Meßbereiches für die in situ -Messung konnten trotz exakter, wiederholter Ausführung keine präzisen Werte gefunden werden. Nach allgemeinen Erfahrungen sollte die Fluoreszenzintensität im unteren bis mittleren Nanogrammbereich der Konzentration direkt proportional sein. Dies traf gerade im unteren Nanogrammbereich am wenigsten zu, die Varianz der Ergebnisse war hier besonders groß, wobei sich im Bereich von 10-50 ng pro Fleck auch eine starke Substanzabhängigkeit zeigte. Dem Verdacht, daß sich die in der Lösung vorliegenden Diamidinkationen der elektronegativen Glaswand der verwendeten Gefäße gegenüber besonders und unterschiedlich affin verhielten, wurde in den folgenden Versuchen nachgegangen.

2.4.1.1. Verdrängung der Diamidine durch strukturähnliche Substanzen

Zunächst wurde versucht, weiterhin die Verwendung von Glasgefäßen durch Zusatz eines Stoffes, der die Amidiniumionen von der Glaswand verdrängt, zu ermöglichen. Naheliegend waren also Substanzen, die ebenfalls Amidino- oder Guanidinogruppen trugen. Aufgrund der geringen Verbreitung Amidiniumgruppen enthaltender Agenzien konnte aus der Literatur kein Hinweis gefunden werden.

Von den strukturähnlichen Diamidinen durften natürlich nur solche in Betracht gezogen werden, die auf die spätere in situ -Fluorimetrie ohne Einfluß blieben.

Es wurden Decan-1,10-diamidin, Benzamidin und Guanidin, alle als Hydrochloride, in die Untersuchungen einbezogen. Von den genannten Amidinen wurden 10 %ige Lösungen in Wasser bereitet und diese als Lösungsmittel für Vergleichslösungen von 102/198 mit einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt. Weiter wurden 2 Lösungen von 1 µg/ml 102/198 in Wasser,

eine in üblichen Glaszentrifugenröhrchen, eine in Polypropylen (PP)-Reagenzgefäßen, hergestellt.

Für alle Lösungen, bis auf den PP-Vergleich, wurden neue Glaszentrifugenröhrchen 13 mm Durchmesser, 100 mm Länge verwendet, die mit je 5 ml Lösung beschickt wurden.

Nach 1 Std. Schütteln der Gläser im Dunkeln wurden je 10 μ l mit einer Eppendorf -Pipette auf die Dünnschichtplatte aufgetragen und chromatographiert. Die Ergebnisse sind in Tab. 6 wiedergegeben; der Flächeninhalt der Probe aus den Polypropylengefäßen wurde mit 100 % gleichgesetzt.

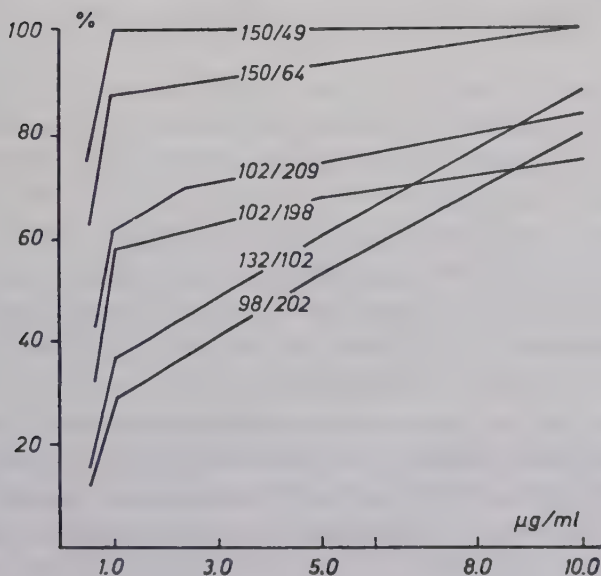
Tabelle 6: Beeinflussung des Glaswandverlustes bei 102/198 durch Guanidin, Benzamidin und Decan-1, 10-diamidin

Lösungsmittel	Gefäßmaterial	mittlere Peakfläche (mm ²)	Gefäßwandverlust (%)
Wasser	Polypropylen	2396	0
Wasser/ Guanidin	Glas	2244	6
Wasser/ Benzamidin	Glas	2236	7
Wasser/Decan- diamidin	Glas	2084	13
Wasser	Glas	1928	20

2. 4. 1. 2. Einfluß von Guanidin auf die Glaswandadsorption
verschiedener Diamidine

Im folgenden Versuch sollte die Adsorption der Diamidine an der Glaswand verdeutlicht, und der Einfluß von Guanidin-hydrochlorid in Abhängigkeit von deren Konzentration und Struktur ermittelt werden. Untersucht wurden 98/202, 102/198 und 150/64 sowie ihre Strukturanalogen mit der Amidin-gruppierung -5.4'-, nämlich 132/102, 102/109 und 150/49. Es wurden die Lösungen 0,5 - 1,0 - 5,0 und 10,0 $\mu\text{g/ml}$ Diamidin in Wasser und in einer Lösung aus 20 % (Gew.) Guanidin-hydrochlorid in Wasser hergestellt. Als Glasgefäße wurden bereits öfter benutzte Glaszentrifugenröhrchen verwendet.

Abb. 14 : Einfluß von Guanidin-HCl auf die Glaswand-
adsorption verschiedener Diamidine in Ab-
hängigkeit von deren Konzentration und Struktur.



Nach 15 stündigem Stehenlassen der Lösungen im Dunkeln wurden je 10 μ l auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen und chromatographiert. Die unter Zusatz von Guanidin ermittelte Konzentration wurde als 100 % gesetzt. In Abb. 14 sind die ohne Guanidinzusatz gefundenen Konzentrationen in Prozent, bezogen auf die mit 20 %iger Guanidinsalzlösung erhaltenen Werte, für die einzelnen Diamidine in Abhängigkeit von der Konzentration wiedergegeben. Wie zu erwarten, wird der Einfluß von Guanidin mit zunehmender Konzentration geringer. Ferner ist eine Abhängigkeit vom Heteroatom und der Stellung der Amidino-Gruppe zu erkennen.

2. 4. 1. 3. Einfluß des Gefäßmaterials auf die Adsorption

Wegen der ermittelten starken Adsorption der Diamidiniumionen an der Glaswand, vor allem im interessierenden unteren Mikrogramm-Bereich, wurde die Verwendbarkeit anderer Materialien für Probenbehälter und Reaktionsgefäße untersucht.

Geeignet wären also unpolare Strukturen wie Polypropylen oder auch Polystyrol.

Zum folgenden Versuch wurden Reagenzgläser aus NALGENE^R, entsprechend Polypropylen, herangezogen; als Vergleich dienten Reagenzgefäße aus Glas sowie Cellulosenitrat. Die Oberflächenadsorption wurde für 98/202, 102/198 und 150/49 untersucht.

Alle Gefäße hatten etwa gleichen Durchmesser und waren bereits öfter benutzt. In diese wurden gleiche Volumina wässriger Lösungen mit 1 μ g/ml Diamidin pipettiert, und die Versuchsansätze 15 Stdn. bei Zimmertemperatur im Dunkeln stehengelassen. Danach wurden von den Lösungen 10 μ l, entsprechend 10 ng pro Fleck, auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen und chromatographiert. In einem Zusatzversuch wurde durch Behandlung von Cellulosenitratgefäßen mit Methanol deren Oberfläche aufgelöst und damit stark vergrößert; an diesen Gefäßen wurde die Adsorption von 102/198 ermittelt. Wie aus der Tab. 7 zu entnehmen ist, wurde in diesem Fall bei

Tabelle 7: Adsorptionsverlust an der Gefäßwand für 98/202, 102/198 und 150/49 in Abhängigkeit vom Gefäßmaterial

	Adsorptionsverlust in % bei			
	Glas	Cellulose-nitrat	Cellulose-nitr. / var.	Polypropylen
98/202	40	11	---	0
102/198	17	22	100	0
150/49	8	5	---	0

der gleichen Konzentration von 1 µg/ml, die Substanz vollkommen an der Gefäßwand festgehalten.

In Tab. 7 ist der Adsorptionsverlust in % für die verschiedenen Gefäßmaterialien wiedergegeben. Da ein Zusatz von 10 % Guanidinhydrochlorid bei den Lösungen in Polypropylengefäßen keine Erhöhung der Wiederfindungsraten ergab, wurden die aus den Polypropylenansätzen ermittelten Werte als 100 % gesetzt.

Weiterhin zeigte sich, daß die absoluten Abweichungen der einzelnen Meßwerte vom Mittelwert bei Verwendung von Cellulosenitrat- und Glasgefäßen gegenüber den Polypropylengefäßen sehr groß waren, was durch die unterschiedliche Abnutzung der bereits gebrauchten Gefäße zu erklären ist.

Da Polypropylen offensichtlich ein geeignetes Gefäßmaterial darstellte und daraus ebenfalls Pipetten im Handel sind, wurde der Verwendbarkeit von Polystyrol- und Polycarbonatgefäßen nicht weiter nachgegangen. Eine Erniedrigung der Polarität der Oberfläche von Glasgefäßen durch Silanisierung brachte keinen Erfolg.

Für sämtliche weiteren Versuche wurden daher Polypropylengefäße verwendet; zur Probenaufbewahrung und Aufarbeitung von Organproben 100 ml Gefäße, zur Anreicherung und Extraktion 100 ml, 9 ml und 1,5 ml Gefäße, sowie Eppendorf-Pipetten mit Polypropylen spitzen (s.Kap. 6.5.).

2.4.2. Wahl des Anreicherungsverfahrens

Wegen der zu erwartenden geringen Substanzkonzentrationen bei der Aufarbeitung von Organproben mußte bei der gegebenen Nachweisgrenze von 0,1 - 0,5 µg/ml Lösung ein Anreicherungsverfahren entwickelt werden, das eine Konzentration um etwa den Faktor 10 liefern sollte. Die häufigste und am besten reproduzierbare Anreicherungs-methode stellt die Extraktion dar, die auf dem unterschiedlichen Verteilungsverhalten der Stoffe beruht. Im Falle der Diamidinumsalze bot sich damit zunächst die Verteilung des Salzes und der freien Base in den geeigneten Lösungsmitteln an, wobei die Extraktion in einem einzigen Schritt erfolgen sollte, d. h. der Unterschied in den Verteilungskoeffizienten von Salz und Base für das gewählte System mußte möglichst groß sein.

Aus den wäßrigen Diamidinumsalzlösungen sollten die Amidine also durch Laugezusatz in Form der freien Basen in eine organische Phase überführt und aus dieser durch Säurezusatz unter Anreicherung wieder in eine Wasserphase extrahiert werden. Diese Methode ist z. B. für Pentamidin beschrieben⁷⁵⁾; als organische Phase fanden Äthylacetat oder n-Butanol Verwendung. Wegen der Hydrolyseempfindlichkeit der freien Base ist die alkalische Extraktion jedoch nur unter Vorsichtsmaßnahmen anzuwenden.

Ein neueres und schonenderes Extraktionsverfahren stellt die Ionenpaar-extraktion dar^{123, 124)}. Dabei werden mit den in wäßrigen Lösungen vorliegenden (Substanz-) Kationen und geeigneten Anionen Ionenpaare gebildet, die in eine organische Phase extrahierbar sind. Die Schwierigkeit liegt im Auffinden geeigneter Ionenpartner, die substanzspezifisch bzw. im vorliegenden Fall der Arbeitsweise mit innerem Standard substanzgruppenspezifisch sein sollten. Für die bearbeiteten Diamidine erwiesen sich Natriumcetylstearylsulfat (Lanette E) und Natriumdodecylsulfat, das letztere wegen seiner besseren Wasserlöslichkeit besonders, geeignet. Als Lösungsmittel für die so gebildeten Ionenpaare waren n-Oktanol und Äthylacetat verwendbar. Bei einmaliger Extraktion waren 85 - 95 % der

Substanzmenge aus der Wasserphase extrahiert. Da die Amidine zur DC-Entwicklung als Salze in wäßriger Lösung aufgetragen werden sollten, mußten sie in einem weiteren Extraktionsschritt unter erneutem Phasenwechsel aus der Ionenpaarbindung freigesetzt werden.

Ferner sollte im Hinblick auf die Aufarbeitung organischen Materials die Extraktion und Anreicherung unter zweimaligem Phasenwechsel erfolgen, da nur so eine saubere Abtrennung organischer Verunreinigungen möglich ist. Die Extraktion der Amidine aus der organischen, ionenpaarhaltigen Phase war zwar mit 0.1 N Salzsäure durchführbar, die Wiederfindungsraten der Ionenpaarextraktionsmethode waren jedoch insgesamt niedriger als bei der Methode über die freien Basen.

Weiterhin brachte diese Methode auch Nachteile bei der chromatographischen Trennung der Amidine. Daher wurde das Anreicherungsverfahren über die Freisetzung der Amidinbasen gewählt.

2.4.3. Wahl des Extraktionsmittels

Bei der Wahl eines geeigneten Lösungsmittels mußten folgende Anforderungen berücksichtigt werden:

- 1) Etwa gleich gute Verteilungseigenschaften für alle zu untersuchenden Amidine
- 2) geringe Wasserlöslichkeit
- 3) Beständigkeit gegen Säure und Lauge
- 4) Gute Pipettierbarkeit (hoher Siedepkt., geringe Benetzung)
- 5) Geringere Dichte als Wasser
- 6) Eignung hinsichtlich der Extraktion von organischen Proben.

Wegen dieser Anforderungen waren n-Butanol und Äthylacetat nicht geeignet. Nach Brodie¹²⁵⁾ ist bei Extraktion von basischen Substanzen aus biologischem Material das unpolarste Lösungsmittel zu wählen,

das die Substanz noch vollständig aus der Wasserphase extrahiert; so werden organische Verunreinigungen am besten verhindert.

Untersucht wurden n-Hexan, n-Butanol - Hexan (1 : 1), n-Oktanol und n-Oktanol - n-Butanol (1 : 1).

Mit n-Oktanol wurde ein Lösungsmittel gefunden, das bis auf gute Pipettierbarkeit alle geforderten Eigenschaften besaß. Seine Löslichkeit in Wasser beträgt bei 20°C $\sim 0.1\%$, es siedet bei 194.5°C und hat eine Dichte von $D_4^{20} = 0.827$. Wegen seiner hohen Viskosität und der damit stärker benetzenden Eigenschaften ist reproduzierbares Pipettieren kaum möglich, was jedoch bei Verwendung eines inneren Standards auch nicht erforderlich ist.

2.4.4. Beständigkeit der Diamidine gegen Natronlauge

Wegen der Hydrolyseempfindlichkeit der Amidinogruppe in alkalischer Lösung wurde untersucht, ob unter den Bedingungen der Extraktionsmethode bereits die Bildung von Hydrolyseprodukten zu erwarten war.

Dazu wurden wäßrige Lösungen der Amidine 98/202, 102/198 und 150/49 mit 2.5 und 5.0 $\mu\text{g/ml}$ bereitet, die mit 2 N Natronlauge auf etwa pH 12-13 alkalisiert wurden. Die Ansätze wurden bei Zimmertemperatur 20 Min. mechanisch geschüttelt, danach erfolgte Ansäuerung mit 2 N Salzsäure. Zum Vergleich dienten gleich konzentrierte Substanzlösungen mit entsprechenden Mengen Natronlauge und Salzsäure.

Nach Chromatographie der Lösungen wurden die Substanzkonzentrationen pro Fleck fluorimetrisch bestimmt, sowie die Chromatogramme auf zusätzliche Fluoreszenzprodukte untersucht.

Aus den identischen Meßwerten ergab sich, daß unter den Bedingungen der Extraktionsmethode die Amidine unzersetzt blieben. Die möglichen Zeretzungsprodukte, Säureamid und Säure, hätten zudem zusätzliche fluoreszierende Flecken mit von den Diamidinen deutlich unterschiedlichen hRF - Werten aufweisen müssen.

3. Tierversuche

3.1. Wahl der Versuchstiere

Für die Untersuchungen zur Pharmakokinetik der Diamidine war der Wahl der Versuchstiere, im Gegensatz zu chemotherapeutischen und chemoprophylaktischen Versuchen mit infizierten Tieren, relativ weite Grenzen gesetzt. Aus technischen und aus Gründen der Kostenbelastung mußte jedoch mit kleineren Laboratoriumstieren vorlieb genommen werden. Im Falle des *Trypanosoma congolense* wirksamen 102/198 sollte das Rind einem späteren, größeren Feldversuch vorbehalten bleiben. Über einen orientierenden Vorversuch mit einem Kalb siehe Kap. 3.4.

Als Laboratoriumstiere für trypanocide Amidine werden in der Literatur meist Mäuse und Ratten beschrieben, seltener Goldhamster, Meerschweinchen und Affen^{20, 126, 127)}. Kaninchen, Hunde und Schafe wurden häufig zur Toxizitätsprüfung verwendet.

Rückschlüsse auf die Pharmakokinetik der Diamidine bei Mensch und Weidewieh können jedoch nur mit starkem Vorbehalt gezogen werden und sind meist nur auf spekulative Betrachtungen hinsichtlich Rückstandsbildung und kumulativ toxischer Effekte beschränkt³⁴⁾.

Sehr ausführliche Verteilungs- und Ausscheidungsversuche trypanocider Substanzen wurden an Ratten und Mäusen durchgeführt^{71, 81, 82, 84)}, die auch einen Vergleich der beiden Tierarten zulassen. Dabei wird ein Nachteil der Maus als Versuchstier deutlich, nämlich die gegenüber der Ratte geringere Serumkonzentration und schnellere Elimination der Diamidine. Serumspiegelbestimmungen wurden daher meist bei Ratten oder größeren Labortieren durchgeführt.

Im vorliegenden Fall wurde die Maus als Testtier gewählt, da sie gegenüber der Ratte einfacher zu handhaben und auch vorteilhafter statistisch auszuwerten ist. Es wurden nur weibliche NMRI Mäuse, Kisslegg, etwa gleichen Alters und Gewichtes verwendet.

3.2. Mäuseversuche

3.2.1. Tierhaltung

Für die einzelnen Ausscheidungsversuche wurden Gruppen von je 5 - 6 Mäusen in spezielle Stoffwechselkäfige der Fa. EHRET (s.Kap. 4.2.) überführt, die mit Vorrichtungen zum getrennten Auffangen von Harn und Faeces ausgestattet sind. Als Standard-Diät wurde Altromin^R jedoch grob pulverisiert angeboten, um ein Verschmutzen der Exkrementauffanggefäße durch überschüssige Nahrung zu vermeiden. Dazu wurden spezielle Futterbehälter mit kontinuierlichem Nachschub für Pulverfutter entwickelt (s. Fußnote).

Wegen des typischen Sozialverhaltens von Laboratoriumsmäusen¹²⁸⁾ wurden eine sorgfältige Auswahl und Anpassung der Mäuse an ihre Umgebung vorgenommen. Mindestens 3-5 Tage vor Versuchsbeginn wurden die Mäusegruppen an ihre Stoffwechselkäfige und den täglichen Reinigungsvorgang gewöhnt. Aggressive Mäuse wurden frühzeitig ausgetauscht, wobei das "Heim-Käfig" -Verhalten¹²⁸⁾ der Tiere zu berücksichtigen war, und der neu zusammengestellten Gruppe wieder etwa 2-3 Tage Zeit zur Anpassung gegeben werden mußte. Dieses zeitraubende Vorgehen war zum Erreichen konstanter Eliminationswerte unbedingt erforderlich.

Die Ausscheidung von Harn und Faeces wurde in 24 Stdn.-Intervallen ermittelt, da bei Laboratoriumsmäusen die Nahrungsaufnahme zyklisch und hauptsächlich nachts erfolgt¹²⁸⁾. Für Blutspiegeluntersuchungen, die regelmäßig tagsüber vorgenommen wurden, blieben die Mäuse in den Vorratsbehältern, ebenso für die Bestimmung der 24 Stdn.-Organkonzentrationen, obwohl durch die bekannte teilweise Wiederaufnahme des ausgeschiedenen Kotes bei Mäusen eine Verfälschung der Ergebnisse durch enterale Rückresorption möglich ist. Wegen der geringen oralen Wirksamkeit der untersuchten Diamidine⁴⁹⁾ jedoch sowie wegen der auch bei

Für die Anfertigung dieser Behälter sowie zahlreicher weiterer, in dieser Arbeit verwendeten Werkstücke danke ich herzlich dem Werkstattmeister des Institutes, Herrn W. K e l l e r, sowie Herrn H. R o t h.

Verwendung von Stoffwechselkäfigen gelegentlichen Wiederaufnahme der Exkremente dürfte eine Verfälschung der Ergebnisse mit den Vorratsbehältern vernachlässigbar gering sein.

3.2.2. Dosierung und Applikation der Diamidine

Für die untersuchten Diamidine war eine mittlere wirksame Dosis (vgl. 1.2.) angestrebt, die einen möglichst großen Nachweiszeitraum umfassen und mit Literaturangaben der bekannten Amidine vergleichbar sein sollte. Daher wurde für alle Versuche eine Dosierung von 10 mg/kg gewählt; für 102/198 wurden ferner Serumspiegel mit der für *T. congolense* noch wirksamen Dosis von 3 mg/kg sowie 20 mg/kg bestimmt. In der Literatur wird die Dosisangabe recht unterschiedlich, entweder bezogen auf die verwendete Salzform der Substanz, oder seltener, berechnet auf die Base, angegeben. Um eine einfachere Vergleichbarkeit von Amidinen mit verschiedenen Anionen zu ermöglichen, wurde für die eigenen Versuche stets die Angabe in mg/kg Substanz, berechnet auf die freie Base, gewählt.

Für die Applikation der wässrigen Amidinlösung kamen nur parenterale Verfahren in Frage. Zur Ermittlung grundlegender pharmakokinetischer Daten, wie Eliminationskonstante, Halbwertszeit und Verteilungsvolumen, ist streng genommen nur die intravenöse Applikation zulässig. Bei i.p., i.m. oder s.c. Applikation muß der Einfluß der Invasion der Substanz in die Blutbahn berücksichtigt und somit ein jeweils eigenes Zeitverhalten in Kauf genommen werden. Prinzipiell läßt D o s t ¹²⁹⁾ jedoch auch andere als i.v. Applikationen zu, wenn die Resorption schneller als die Elimination verläuft. Bei den eigenen Untersuchungen wurde daher die bei den Mäusen einfachere i.p.-Applikation bevorzugt, da, wie die Serumspiegelkurven ergaben, die Invasion offensichtlich sehr rasch erfolgt. So zeigten auch vergleichende Serumspiegeluntersuchungen von Fulton und Goodwin ⁷¹⁾, daß bei den verschiedenen Applikationsarten für

Stilbamidin Serummaxima und Eliminationsverhalten nicht wesentlich variierten.

3.2.3. Probengewinnung

Zur Bestimmung wurden Blut- und Organproben entnommen, sowie die Harn- und Faecesausscheidung gesammelt.

3.2.3.1. Serum

Die Blutentnahme bei der Maus erfolgte mittels heparinisiertem Hämatokritröhrchen aus dem retroorbitalen Venenplexus¹³⁰⁾ und anschließender Zentrifugation zur Gewinnung des Plasmas. Von diesem konnten dann 5, 10 oder maximal 20 µl Plasma direkt auf die Sorptionsschicht der Dünnschichtplatte aufgetragen werden. Diese Methode eignet sich jedoch nur für die höheren Konzentrationen bis etwa 1 µg/ml, die nur bis ungefähr 1 Stunde nach Applikation auftraten, da eine Anreicherung der Amidine mit dieser Technik, wegen der geringen Plasmamenge sehr schwer möglich ist. Wegen der später beobachteten hohen Glaswandaffinität der Diamidinsalze (s. Kap. 2.4.1.) wurde diese Methode verlassen, obwohl durch die mehrfach mögliche Blutentnahme durch die gleiche Öffnung der Tenon'schen Kapsel innerhalb kurzer Zeit¹³⁰⁾ der Eliminationsverlauf bei der einzelnen Maus gut verfolgbar wäre.

Daher erfolgte bei späteren Versuchen vollständiges Ausbluten der äthernarkotisierten Mäuse nach Eröffnung des retroorbitalen Venenplexus.

Für Entnahmezeiten von 0.25 - 1 Stunde konnte dieses Serum mit dem verwendeten Entwicklungssystem direkt chromatographiert werden. Serumproben ab 1 Stunde wurden nach Zugabe des inneren Standards vor dem Anreicherungsverfahren mit dem gleichen Volumen 0.9 %iger NaCl-Lösung verdünnt und aufgearbeitet, bzw. bis zur Aufarbeitung aufbewahrt.

Blutproben wurden nach 0.25 - 0.5 - 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 8 - 13 und 24 Stunden, bzw. bis Erreichen der Nachweisgrenze, entnommen.

3.2.3.2. Harn und Faeces

Das getrennte Auffangen von Harn und Faeces bei der Maus ist bis heute noch nicht restlos zufriedenstellend möglich, obwohl zahlreiche Stoffwechselkäfige verschiedenster Art im Handel sind. Nach längeren Versuchen mit selbstgefertigten Käfigen wurde letztlich doch auf einen Stoffwechselkäfig der Fa. EHRET (s.Kap. 4,2.) zur Haltung mehrerer Tiere zurückgegriffen, der nach geringfügiger Modifikation ausreichende Trennung von Harn und Kot gewährleistete. Bei Verwendung derartiger Käfige muß nach eigenen Erfahrungen jedoch mit im Extremfall bis zu 20 % Verlust gerechnet werden.

Harn und Faeces wurden in 24 Stdn.-Intervallen gesammelt. Harn der Tage 1 - 3 konnte ohne Anreicherung nach Verdünnen mit Wasser auf ungefähr 1 µg/ml direkt bestimmt werden. Probenvorbereitung für Harn ab 3.Tag sowie für Faeces und Zugabe innerer Standard siehe Kap. 6.4. Für Faeces galt das "Feuchtgewicht".

3.2.3.3. Organe

Gemäß der Aufgabenstellung wurden folgende Organe entnommen: Leber, Nieren, Gehirn, Fellproben und Muskelproben von jeweils 5 - 6 Tieren und zwar nach 24 Stdn. und nach 14 Tagen, bzw. Versuchsende. Vor der Organentnahme wurden die äthernarkotisierten Mäuse ausgeblutet und mittels Genickschlag getötet. Lebern, Nieren und Gehirn wurden gesamt, von Fell und Muskel jeweils Proben von etwa 2 g entnommen.

3.2.4. Probenvorbereitung und -aufbewahrung

Die erhaltenen Proben wurden in Polypropylengefäßen gesammelt, mit 0.9 %iger NaCl-Lösung und innerem Standard, wie in Kap. 6.4. angegeben, versetzt und im allgemeinen anschließend aufgearbeitet. Erfolgte die Aufarbeitung zu späterer Zeit, wurden die so vorbereiteten Proben sofort bei

-18°C tiefgefroren und aufbewahrt.

Die Gehaltsbestimmung frischer sowie 4 Wochen bei -18°C aufbewahrter Proben erbrachte keinen Konzentrationsunterschied.

3.2.5. Probenaufarbeitung

3.2.5.1. Harn und Serum ohne Anreicherung

Mit dem gewählten Chromatographiesystem war es möglich, Harn und Serum direkt aufzutragen und zu entwickeln.

Um für alle Analysenproben Substanzflecken von etwa 10 ng - 50 ng zu erhalten, wurden die Proben entsprechend verdünnt. Verdünnungsmittel für Serum und Harn war 0,9 % Natriumchloridlösung. (Es bestand kein Unterschied in den Wiederfindungsraten, wenn statt 0,9 % Natriumchloridlösung Wasser oder Leerserum, bzw. Leerharn verwendet wurde). Wegen der hohen Wiederfindungsraten und der genügenden Reproduzierbarkeit beim direkten Auftragen von verdünnten Harn- und Serumproben wurde kein innerer Standard zugefügt. Das Auftragen von unverdünntem Harn und Serum mit der Eppendorf-Pipette war jedoch weniger gut reproduzierbar, da die Pipettenspitzen davon stärker benetzt wurden als von nachträglich verdünnten Proben. Maximal waren 20 µl aufzutragen, für 10 µl ergaben sich aber sauberere Trennungen. Die letzten durch direktes Auftragen noch zu ermittelnden Probenkonzentrationen wurden zum Vergleich noch ein zweites Mal unter Anreicherung mit innerem Standard ermittelt.

3.2.5.2. Extraktion und Anreicherung der Organproben

3.2.5.2.1. Homogenisierung der Proben

Zur Extraktion der Amidine aus Faeces und Organproben mußten diese zunächst mit Hilfe eines Homogenisators zerkleinert werden. Homogenisie-

ren von Faeces im Ultraschallbad brachte keinen Erfolg; als geeignet erwies sich ein Homogenisator der Fa. E. BÜHLER mit rotierenden Messern, die in der Größe den Proben und Behältern anzupassen waren. Zum Nachweis von Pentamidin in Gewebe, Organen und Faeces homogenisierte man mit der 5 - 7fachen Menge 0.1N Salzsäure⁷⁵⁾. Bei eigenen Versuchen mit der 5 und 10fachen Flüssigkeitsmenge wurden mit dem größeren Extraktionsvolumen erwartungsgemäß bessere Wiederfindungsraten erhalten. Noch größere Volumina sind wegen des anschließenden Anreicherungsverfahrens wenig sinnvoll. Wie bei Münch¹²¹⁾ beschrieben, erschien es auch hier günstiger, als Extraktionsmittel 0.9% Natriumchloridlösung zu verwenden. Harn und Serum wurden zur Extraktion mit der gleichen Menge 0.9% Natriumchloridlösung versetzt.

3.2.5.2.2. Guanidinzusatz

Die geringen Wiederfindungsraten vor allem bei Faecesproben ließen auf eine starke Affinität der Amidine zu organischen Strukturen, wahrscheinlich Ribonucleinsäuren, schließen. Die geringsten Wiederfindungsraten wurden für 102/198 gefunden, von dem die starke Affinität zur DNA bekannt ist⁶²⁾; 150/49 brachte die besten Wiederfindungsraten. Es wurde daher versucht, ähnlich wie bei der Ermittlung zur Glaswandaffinität der Diamidine (Kap. 2.4.1.1.), durch Zusatz von strukturähnlichen Substanzen im Überschuß die Wiederfindungsraten zu verbessern. Untersucht wurde der Einfluß von Guanidinhydrochlorid, Decandiamidindihydrochlorid und Benzamidinhydrochlorid verschiedener Konzentration. So ergab ein Zusatz von 10% Guanidinhydrochlorid bezogen auf das Faecesgewicht eine Steigerung der Wiederfindungsrate um 30%. Der Einfluß von Decandiamidin und Benzamidin war jedoch wesentlich stärker, im Vergleich zur Verwendung von Guanidin waren die Wiederfindungsraten etwa doppelt so hoch. Dieser deutliche Effekt wurde bei Extraktionen mit der 5fachen Menge Extraktionsmittel, bezogen auf die Probe, gefunden.

Für die letztlich gewählte Aufarbeitungsmethode mit der 10fachen Extraktionsmittelmenge war der Unterschied geringer. Benzamidin und Decandiamidin behinderten jedoch das anschließende Anreicherungsverfahren, so daß bei der endgültigen Aufarbeitungsmethode Guanidin eingesetzt wurde, das auch kostenmäßig vertretbar war. Für Faeces- und Organextraktionen wurden 50 % Guanidin, bezogen auf das Probengewicht, für Harn und Serum ungefähr 10 % zugesetzt.

3.2.5.2.3. Anreicherung

Zu den so extrahierten Proben wurde direkt die organische Phase zugegeben und der Ansatz mit 2 N Natronlauge alkalisiert. Durch 15 Min. vorsichtiges, maschinelles Rotieren der Proben wurden die freigesetzten Amidinbasen in die Oktanolphase überführt. Stärkeres Rotieren oder Schütteln verursachte kaum trennbare Emulsionen. Unter den gewählten Bedingungen trat eine Eiweißfällung auf, wobei sich das gefällte Protein nach dem Zentrifugieren in einer dünnen Schicht zwischen Wasser- und Oktanolphase absetzte, ohne das Abpipettieren der organischen Phase zu behindern. Von der Oktanolphase wurden der zu erwartenden, bzw. im Vorversuch ermittelten Substanzkonzentration entsprechende Anteile abpipettiert und analog dem in Kap. 6.5.2. geschilderten Anreicherungsverfahren weiterverarbeitet, so daß für die DC eine Konzentration von 10-50 ng/Substanzfleck erhalten werden konnte.

3.2.6. Berechnung der Ergebnisse

Die Berechnung der Analysen erfolgte mit Hilfe von 2 - 3 Vergleichen verschiedener Konzentration, die über das Chromatogramm verteilt wurden. Wie in Kap. 2.3. beschrieben, ist die Peakfläche der Konzentration direkt proportional, wenn innerhalb des linearen Meßbereiches gearbeitet wird. Bei der Aufarbeitung mit innerem Standard wurden Vergleichslösungen aufgetragen, die gleiche Mengen Vergleichssubstanz und inneren Standard

enthielten, wodurch Platz auf dem Chromatogramm gespart, vor allem aber gleiche Chromatographiebedingungen erreicht wurden. Jede Probe wurde zweimal aufgearbeitet und jede Probenaufarbeitung mindestens zweimal aufgetragen. Die Auswertung erfolgte nur durch Werte, die auf einem einzigen DC gewonnen wurden. Wegen der bei Harn, Faeces, Serum und Organproben unterschiedlichen und innerhalb einer Probe schwankenden Wiederfindungsraten auch bei exakter Arbeitsweise, wurden die erhaltenen Werte mit einem Korrekturfaktor, der über die Wiederfindungsraten von Substanz und innerem Standard ermittelt wurde, berichtigt. Wie in Kap. 3.2.7.2. beschrieben, war der Quotient aus Wiederfindungsrate innerer Standard / Wiederfindungsrate Substanz trotz schwankender Wiederfindungsraten genügend konstant.

Beim direkten Auftragen von Harn und Serum mit Konzentrationen bis mind. 1 µg/ml wurden die erhaltenen Werte, wegen der guten Wiederfindungsraten von 90 - 100 %, ohne inneren Standard berechnet und auch nicht korrigiert.

Der auf etwa 10 - 20 % zu schätzende Verlust bei der Probengewinnung von Harn und Faeces ist in den angegebenen Werten nicht berücksichtigt.

3.2.7. Reproduzierbarkeit der Ergebnisse aus den Tierversuchen

3.2.7.1. Bestimmung der Wiederfindungsraten

Zur Bestimmung der Wiederfindungsraten mußte zunächst die für vollständige in vitro- Absorption erforderliche Inkubationszeit ermittelt werden, welche den in vivo- Verhältnissen als am ehesten entsprechend angesehen wurde. Dazu wurden Serum, Harn, Faeces und Organproben mit Substanzmengen aus dem mittleren Konzentrationsbereich und 0,9 %iger Natriumchloridlösung analog den Extraktionsbedingungen aus Kap. 6.4. und 6.5. versetzt und im Falle der Faeces und Organproben 5 min homogenisiert. Anschließend mußten die Ansätze noch 2 - 3 Stdn. bei 20°C stehen, um optimale Absorption zu erreichen. Eine Verlängerung der In-

kubationszeiten und Temperaturerhöhung auf 40°C ergab keine Verminderung der Wiederfindungsraten. Daher erfolgte die Substanzzugabe bei der Ermittlung der Wiederfindungsraten für verschiedene Konzentrationen als auch die Zugabe des inneren Standards bei der Probenbestimmung mindestens 3 Stdn. vor Beginn der Probenaufarbeitung.

Die genaue Einhaltung der Inkubationszeit war erforderlich, da bei dem gewählten Aufbereitungsverfahren mittels Homogenisation und Extraktion die Wiederfindungsraten aus biologischem Material mitunter deutlich weniger als 100 % betrugen.

Für Pentamidin fanden W a a l k e s et al.⁷⁵⁾ bei menschlichem Plasma Wiederfindungsraten von 80-100 % für Konzentrationen von 0,2 - 1,4 µg/ml, bei Harn, Faeces und Gewebe von Mäusen 85 - 100 % für Konzentrationen von 5 - 40 µg/ml bzw. g.

Bei Substanzen, die, wie die hier untersuchten, eine starke Affinität zu bestimmten zellulären Strukturen besitzen, sowie bei Proben mit geringeren Substanzkonzentrationen ist jedoch mit niedrigeren Wiederfindungsraten zu rechnen.

In der Tab. 8, 9 sind die Wiederfindungsraten bei verschiedenen Konzentrationen für die beiden offensichtlich unterschiedlich gewebeaffinen Diamidine 102/198 und 150/49 angegeben. Die Wiederfindungsraten bei direktem Auftragen von Serum und Harn wurden mit Konzentrationen von 0.5 und 1.0 µg/ml bestimmt. Sie betrugen für 98/202, 102/198 und 150/49 um 91-100 %.

Eine Erklärung für die schlechten Wiederfindungsraten bei den Faecesproben mag deren Gehalt an Nukleotiden, Serinproteasen und unverdaulicher Nahrungsbestandteilen sein.

Tabelle 8 : Wiederfindungsraten für 150/49 aus biologischem Material

Probenmaterial (150/49)	Anzahl der Be- stimmungen	Konzentrations- bereich ($\mu\text{g/ml}$ bzw. g)	Wieder- findungs- raten (%)
Serum	35	0.05 - 0.2	39 - 95
Harn	35	0.05 - 0.2	81 - 94
Faeces	30	0.5 - 1.0	32 - 63
Leber/Nieren	20	5.0 - 50.0	100
Gehirn/Muskel/Fell	15	1.0 - 2.0	76 - 100

Tabelle 9 : Wiederfindungsraten für 102/198 aus biologischem Material

Probenmaterial (102/198)	Anzahl der Be- stimmungen	Konzentrations- bereich ($\mu\text{g/ml}$ bzw. g)	Wieder- findungs- raten (%)
Serum	20	0.05 - 0.2	36 - 87
Harn	20	0.05 - 0.2	56 - 68
Faeces	15	0.5 - 1.0	14 - 31
Leber/Nieren	15	5.0 - 50.0	80 - 100
Gehirn/Muskel/Fell	15	1.0 - 2.0	45 - 79

3. 2. 7. 2. Relation der Wiederfindungsraten von innerem Standard zur Substanz

Wie aus den stark schwankenden Werten der Wiederfindungsraten (Tab. 8, 9) zu ersehen ist, war die Berechnung der Probengehalte bei niedriger Konzentration, und vor allem der Faecesproben, allein über einen Korrekturfaktor für eine mittlere Wiederfindungsrate zu ungenau. Es zeigte sich jedoch, daß der Quotient der Wiederfindungsraten von innerem Standard und von Substanz für eine bestimmte Konzentration bei den Versuchen zu Tab. 8 u. 9 recht konstant war und sich auch über größere Konzentrationsbereiche nur wenig änderte. Tab. 10 u. 11 verdeutlicht dies wieder am Beispiel 150/49 und 102/198 für Serum und Faeces.

Tabelle 10:

Quotient der Wiederfindungsraten von 150/49 und 102/198

bei Serum. $\bar{x}$ = Mittelwert der gefundenen Quotienten,

$\Delta \bar{x}_{rel.}$ = relative maximale Abweichung vom Mittelwert.

Serum-konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Wiederfindungs- raten-Quotient $\bar{x}$	$\Delta \bar{x}_{rel.}$ (%)
0.05	1.18	5.1
0.1	1.16	6.0
0.2	1.11	4.5

Tabelle 11:

Quotient der Wiederfindungsraten von 150/49 und 102/198

bei Mäusefaeces. Zeichenerklärung s. o.

Faeces-konzentration ($\mu\text{g/g}$)	$\bar{x}$	$\Delta \bar{x}_{rel.}$ (%)
0.5	2.25	5.8
1.0	2.08	3.1

Ein Vergleich mit den in Kap. 3.2.7.1. beschriebenen Wiederfindungsraten zeigt, daß trotz stark schwankender Wiederfindung, bei Faeces sogar bis zu 50 %, der Wiederfindungsraten-Quotient von innerem Standard und von Substanz im vergleichbaren Konzentrationsbereich weniger als 8 % differierte. Die gefundenen Substanzkonzentrationen wurden daher mit den entsprechenden Wiederfindungsraten-Quotienten und den für die einzelnen Proben gefundenen Wiederfindungsraten des inneren Standards korrigiert. (Zur Berechnung s. Kap. 6.6.).

3.2.7.3. Präzision und Richtigkeit

Um die Reproduzierbarkeit der gesamten Analysenmethode von der Probenaufarbeitung bis einschließlich der Fluorimetrie zu bestimmen, wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen 15 Faecesvergleichsproben mit zugesetzten Mengen von 0.5 µg/g 102/198 und 150/49 sowie 7 Proben mit Mengen von 1.0 µg/g aufgearbeitet. Für die Konzentration 0.5 µg/g Faeces wurde ein Variationskoeffizient von 7.1 % für die Konzentration 1.0 µg/g von 5.7 % gefunden. Für die Beurteilung der Richtigkeit der Analysen bedeutet dies eine Fehlerbreite von rund $\pm 20\%$.

Die Proben wurden außerdem mit zu verschiedenen Zeiten gesammelten Leerfaeces durchgeführt. Somit schließen die Variationskoeffizienten auch Schwankungen in der Beschaffenheit des biologischen Materials ein, wie sie auch für die Analysenproben zu erwarten waren.

Bei der Aufarbeitung von Harn-, Serum- und Organproben war die Varianz besser.

Beim direkten Auftragen von unverdünntem Serum mit 1 µg/ml bis 10 µg/ml 102/198 wurden Variationskoeffizienten bis 4.3 % ermittelt, die auf die starke Benetzbarkeit der Pipettenspitzen mit Serum zurückzuführen sind.

Um die Analysenmethode zu kontrollieren und um systematische Fehler zu erkennen, wurden bei einigen Aufarbeitungen Richtigkeitskontrollproben

nebenher bearbeitet; ihre Abweichung vom Sollwert lag stets innerhalb des 3 fachen Variationskoeffizienten.

3.3. Ergebnisse der Mäuseversuche

3.3.1. Serumspiegel und pharmakokinetische Daten

Die Darstellung der Serumspiegelkurven erfolgte im halblogarithmischen Koordinatensystem mit linearer Zeiteinteilung auf der Abszisse und logarithmisch eingeteilter Ordinate zur Angabe der Serumkonzentration. Bei dieser Darstellung sind für die meisten körperfremden Stoffe nach D o s t ¹²⁹⁾ die Blutspiegelkurven als Geraden zu erhalten, da deren Absinken im Sinne einer einfachen Exponentialfunktion erfolgt.

Die Werte der Serumkonzentration je Zeitpunkt wurden im allgemeinen aus 3 - 4 Gruppen von 4 - 6 gemeinsam ausgebluteten Mäusen, mindestens jedoch aus 2 Gruppen von je 5 Mäusen, ermittelt und zur Darstellung im halblogarithmischen Raster einzeln aufgezeichnet; zur Angabe in der Tab. 12 wurden die Werte arithmetisch gemittelt.

Die Zeichnung der Regressionsgeraden erfolgte durch ein Rechenprogramm für den HP Calculator 9820 A mit angeschlossenem Plotter. Aus den Serumspiegelwerten wurden folgende pharmakokinetische Daten ermittelt:

Die Eliminationskonstante, $k_2 (h^{-1})$, entsprechend der Steigung des linearen Teils der Kurve im halblogarithmischen Raster.

Die Eliminationshalbwertszeit, $t_{50\%} (h)$, oder biologische Halbwertszeit, die angibt, in welcher Zeitspanne der Blutspiegel y jeweils auf die Hälfte des betrachteten Wertes absinkt.

Ferner die fiktive Anfangskonzentration, $C_0 (\mu g/ml)$; sie entspricht derjenigen Konzentration, die sich ergeben würde, wenn das Verteilungsgleichgewicht im Verteilungsraum bereits unmittelbar zum Zeitpunkt der Injektion eingestellt wäre.

Tabelle 12: Serumspiegel und pharmakokinetische Daten bei der Maus.
Zeichenerklärung s. Kap. 3.3.1.

Substanz Dosis (mg/kg)	Zeit p. appl. (h)	Serum- spiegel ($\mu\text{g/ml}$)	k_2 (h^{-1})	$t_{50\%}$ (h)	C_o ($\mu\text{g/ml}$)	Δ (ml/g)	r
102/198 10	0.25	5.2	3.12	0.22	9.5	1.05	-0.92
	0.5	2.3					
	1.0	0.54					
	2.0	0.18					
	3.0	0.14	0.17	4.0	0.25	40	-0.88
	4.0	0.10					
	5.0	0.085					
	6.0	0.070					
	7.0	0.054					
	8.0	0.059					
	13.0	0.025					
102/198 3	0.25	0.44	2.6	0.27	0.9	3.3	-0.91
	0.5	0.19					
	1.0	0.045					
	2.0	0.020					
102/198 20	0.25	5.2	2.48	0.28	29	0.69	-
	0.5	8.7					
	1.0	3.2					
	2.0	0.30	0.14	4.95	0.47	42.6	-0.86
	3.0	0.35					
	4.0	0.27					
	6.0	0.16					
	8.0	0.15					
	12.0	0.087					
102/198 dodecyl- sulfat 10	0.25	2.0	1.99	0.35	4.2	2.4	-0.95
	0.5	1.27					
	1.0	0.46					
	2.0	0.17					
	3.0	0.15	0.14	5.0	0.24	42.6	-0.91
	5.0	0.10					
	6.0	0.095					
	8.0	0.065					
	13.0	0.034					
Berenil ^R 10	0.25	5.6	-	-	-	-	-
	0.5	1.25					
	1.0	0.55					

Forts. Tab. 12:

Substanz Dosis (mg/kg)	Zeit p. appl. (h)	Serum- spiegel ($\mu\text{g/ml}$)	k_2 (h^{-1})	$t_{50\%}$ (h)	C_o ($\mu\text{g/ml}$)	Δ (ml/g)	r
98/202 10	0.25	1.08	2.36	0.29	3.0	3.3	-0.89
	0.5	0.56					
	1.0	0.17					
	2.0	0.12	0.34	2.04	0.24	41.7	-0.95
	3.0	0.11					
	5.0	0.036					
	6.0	0.035					
150/49 10	0.25	2.26	3.58	0.19	8.0	1.25	-0.85
	0.5	0.46					
	1.0	0.16					
	2.0	0.13	0.085	8.15	0.16	62.5	-0.9
	3.0	0.11					
	4.0	0.12					
	6.0	0.07					
	8.0	0.064					
	13.0	0.050					
	24.0	0.020					

Tabelle 13: Serumspiegel und pharmakokinetische Daten beim Kalb.
Zeichenerklärung s. Kap. 3.3.1.

Substanz Dosis (mg/kg)	Zeit p. appl. (h), (d)	Serum- spiegel ($\mu\text{g/ml}$)	k_2 (d^{-1})	$t_{50\%}$ (d)	C_o ($\mu\text{g/ml}$)	Δ (ml/g)	r
102/198 10	0.5 ^h	1.8	-----	-----	-----	-----	-----
	1.0	1.15					
	2.0	0.72					
	5.0	0.46					
	8.0	0.37					
	24.0	0.17					
	30.0	0.18					
	48.0	0.12					
	54.0	0.13					
	72.0	0.083					
	96.0	0.074					
	7.0 ^d	0.065	0.018	38.5	0.075	133	-----
	15.0	0.058					
	23.0	0.049					
	79.0	0.024					

Aus der Dosis pro Körpergewicht und der fiktiven Anfangskonzentration (C_0) läßt sich dann der Serum-Distributionskoeffizient Δ (ml/g) errechnen. Werden Distributionskoeffizienten über 1.0 gefunden, scheint das Verteilungsvolumen größer als das Gesamtkörpervolumen zu sein. Dies deutet auf bevorzugte Anreicherung der Substanz in bestimmten Geweben, bzw. Organen hin und ist damit auch ein Maß für die Rückstandsbildung.

Die pharmakokinetischen Daten der untersuchten Diamidine sowie die Korrelationskoeffizienten der einzelnen Eliminationsphasen sind in Tab. 12 wiedergegeben.

Aus der graphischen Darstellung ist für den beobachteten Zeitraum eine zweiphasige Elimination zu erkennen; mit einer schnellen Eliminationsphase in der 1. Stunde mit Halbwertszeiten von etwa 0.2 Stdn., die in eine langsamere überging mit Halbwertszeiten von 2-8 Stdn., wobei 98/202 die schnellste Elimination zeigte (s. Abb. 15-17).

An den hohen Distributionskoeffizienten, vor allem in der 2. Eliminationsphase, ließ sich eine starke Anreicherung aller getesteten Substanzen im Gewebe ableiten. Aus der ermittelten Elimination für den Nachweiszeitraum darf jedoch insgesamt nicht nur auf ein (fiktives) Zweikompartmentensystem geschlossen werden.

Ferner ist allen Substanzen eine rasche Invasion ins Blut gemeinsam, da die maximalen Serumkonzentrationen für 10 mg/kg Dosierung bereits nach längstens 0.25 Stunden gefunden wurden.

Für 102/198 zeigten die auf den Zeitpunkt Null extrapolierten Serumkonzentrationen eine Dosisabhängigkeit.

Die Serumspiegel von Berenil 10 mg/kg sind nur zur Orientierung bestimmt worden, da mit der verwendeten Nachweismethode ⁷²⁾ bei der Maus, wegen der raschen Elimination, die Nachweisgrenze bereits nach 1 Stunde erreicht war. Auch hier entsprachen die schnelle Invasion und die maximalen Serumspiegel etwa den untersuchten Diamidinen.

Eine Gegenüberstellung von 102/198 als Dilactat und als Dodecylsulfat

ergab ähnliche Halbwertszeiten in der zweiten Eliminationsphase und nur unwesentlich höhere Serumspiegelwerte für das Dodecylsulfat; in der ersten Eliminationsphase erfolgte jedoch beim Dodecylsulfat die Elimination langsamer, und der maximale Serumspiegel betrug weniger als die Hälfte des Wertes für das Dilactat.

(Zur Herstellung der 102/198 -Dodecylsulfat-Injektionslösung s.S. 101)

In den folgenden Abbildungen 15-18 sind die Serumspiegelkurven der untersuchten Diamidine für Maus und Kalb wiedergegeben.

Abbildung 15: Serumspiegel von 102/198 bei der Maus nach i. p. - Applikation von 3, 10 und 20 mg/kg 102/198 -Dilactat.

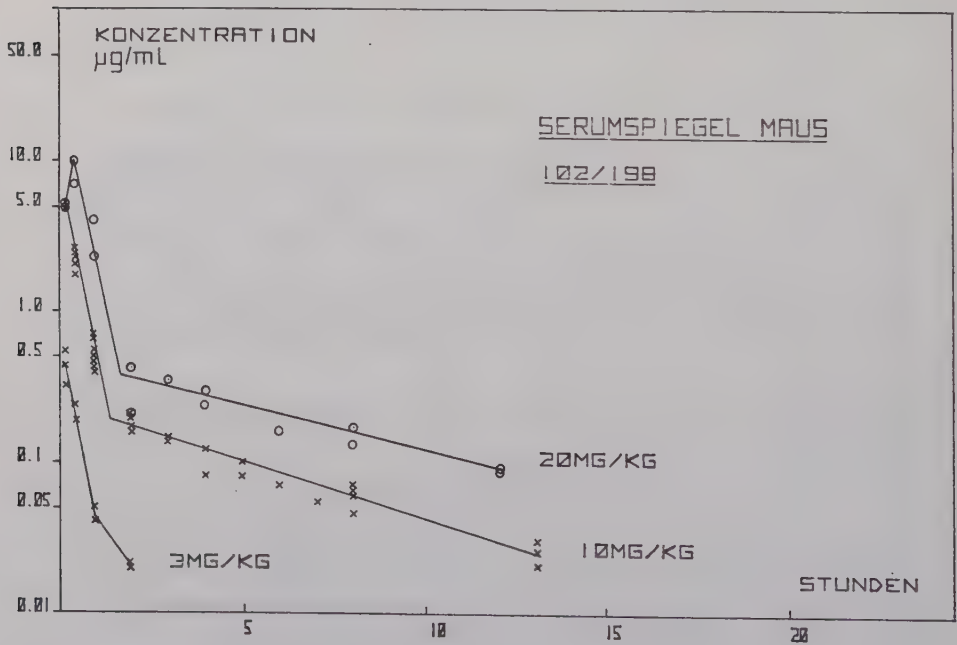


Abbildung 16 : Serumspiegel von 98/202, 150/49 und Berenil bei der Maus

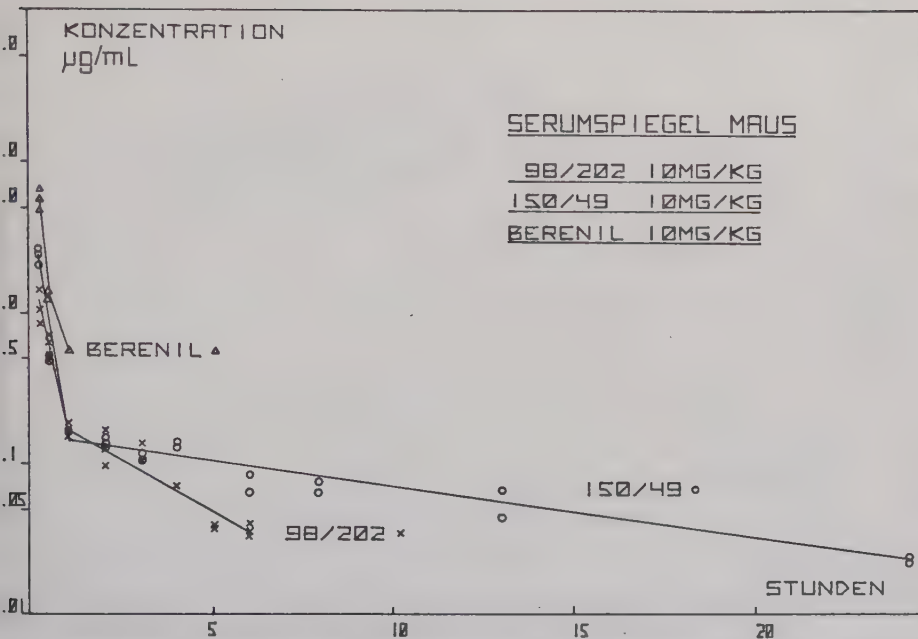


Abbildung 17 : Serumspiegel von 102/198 Dilactat und Dodecylsulfat bei der Maus

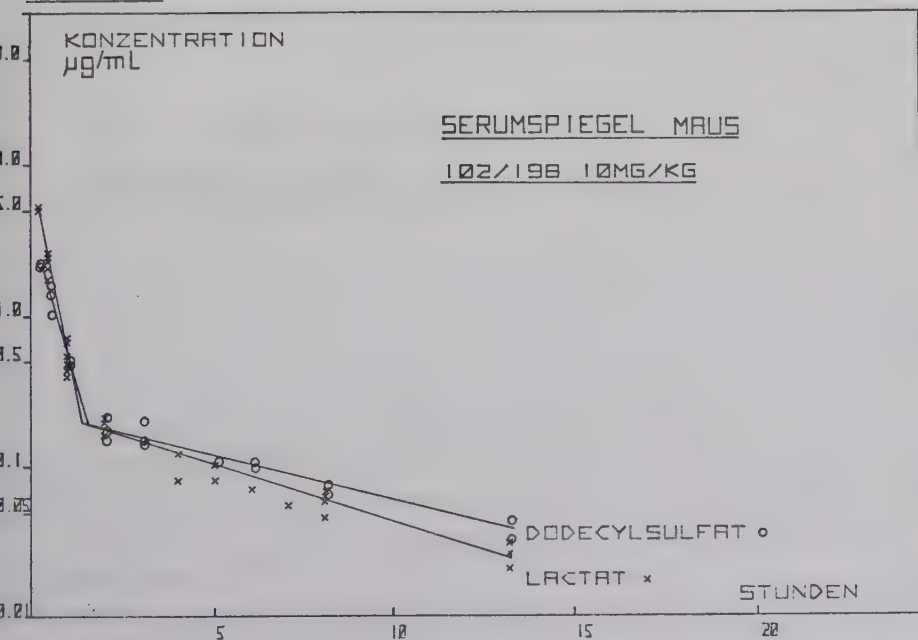


Abbildung 18a : Serumspiegel von 102/198 beim Kalb

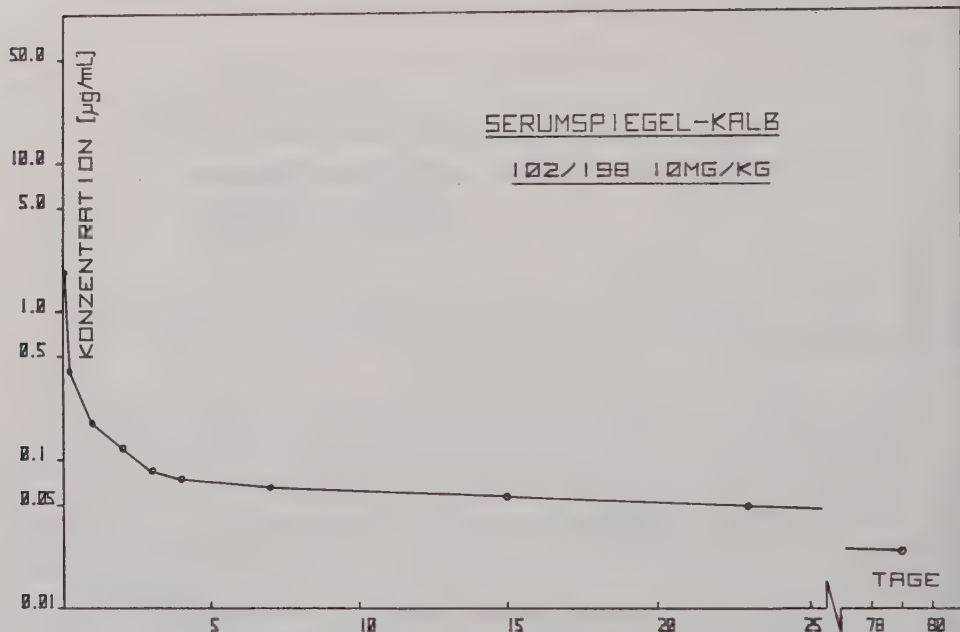
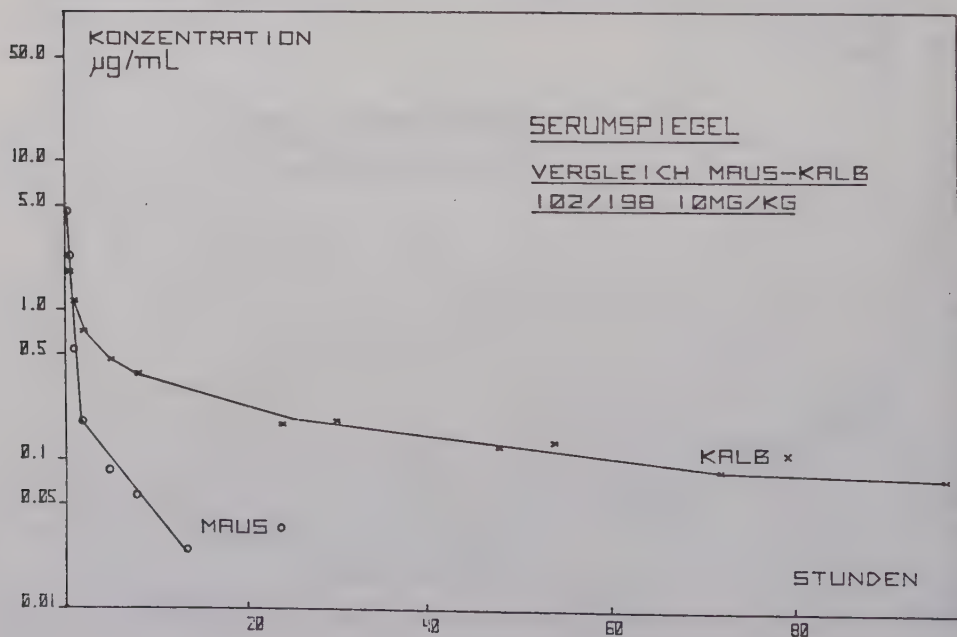


Abbildung 18b : Vergleich der Serumspiegel von 102/198 bei Maus und Kalb



3.3.2. Harn- und Faeces- Elimination

Die für die Elimination pro Tag ermittelten Werte wurden aus 24 Stunden-Sammelproben von durchschnittlich 2 Gruppen von 5-6 gemeinsam im Stoffwechselkäfig gehaltenen Mäusen gewonnen. Bei der Auswertung der Versuche wurde zunächst die Substanzkonzentration pro ml Harn bzw. g Faeces errechnet. Wegen der unterschiedlichen Menge der pro 24 Stunden angefallenen Exkrementen sowie des Verdünnungseffektes durch Nachspülen der Stoffwechselkäfige zur quantitativen Erfassung der ausgeschiedenen Harnmenge waren diese Werte jedoch stark schwankend und zur Darstellung wenig informativ. Die daraus errechnete Gesamtausscheidung der Substanz pro Tag für gleiche Testgruppen zeigte jedoch wieder gute Korrelation. Da die Angabe der Elimination in ausgeschiedener Menge Substanz pro Zeitintervall jedoch von der Dosis und damit der Testgruppe abhängig ist, erschien diese Form der Wiedergabe für eine Betrachtung der Elimination mehrerer Testgruppen ebenfalls nicht sinnvoll.

Daher wurde für die graphische Darstellung sowie für die Tab. 14 die Ausscheidung als Funktion der ausgeschiedenen Substanzmenge in Prozent der applizierten Dosis von der Zeiteinheit gewählt. Diese Angabe (% appl. Dosis/Tag) wird häufig verwendet und ist zum Vergleich von Ausscheidungsverhältnissen am anschaulichsten.

Zur Verdeutlichung der Pharmakokinetik wurden die Tageswerte einzeln im halblogarithmischen Raster wiedergegeben. Ein ausgedruckter Wert entspricht mindestens dem Sammelwert von 5-6 Mäusen (s. Abb. 19, 20, 21). Zusätzlich wurde die kumulative Gesamtausscheidung von Harn und Faeces nach jedem Tag in Prozent der applizierten Dosis dargestellt (s. Abb. 22). Es zeigte sich, daß die Substanzen unterschiedlich über Harn und Faeces größtenteils in den ersten 5 Tagen ausgeschieden wurden.

Während beim Harn innerhalb der ersten 24 Stunden die höchste Ausscheidung erfolgte, war für die Faecesausscheidung eine Verzögerung zu erkennen. So wurde hier die ausgeschiedene Höchstmenge erst am 2. Tag ermittelt, bzw. bei 150/49 zu gleichen Teilen am 1. und 2. Tag. Auch im

Tabelle 14: Harn- und Faeceselimination bei der Maus für
98/202, 102/198 und 150/49 je 10 mg/kg i.p.

	Tage p. appl.	H a r n		F a e c e s		H a r n u n d F a e c e s gesamtelimin. Dosisanteil p. appl. (%)
		elimin. Dosis- anteil pro Tag (%)	elimin. Dosis- anteil p. appl. (%)	elimin. Dosis- anteil pro Tag (%)	elimin. Dosis- anteil p. appl. (%)	
98/202	1	7.9	7.9	7.6	7.6	15.5
	2	2.8	10.7	8.1	15.7	26.4
	3	1.8	12.5	4.5	20.2	33.0
	4	1.25	13.8	2.9	23.1	36.8
	5	0.65	14.4	1.5	24.6	38.9
	6	0.45	14.9	1.0	25.6	40.1
	7	0.35	15.2	0.60	26.2	41.3
	8	0.40	15.6	0.33	26.5	42.0
	9	0.32	15.9	0.20	26.7	42.5
	10	0.30	16.2	0.25	26.9	43.1
	11	0.28	16.5	0.29	27.2	43.7
	12	0.22	16.7	0.17	27.3	44.0
	13	0.20	16.9	0.17	27.5	44.4
	14	0.18	17.1	0.12	27.6	44.7
	15	0.14	17.2	0.10	27.7	44.9
	16	0.11	17.4	0.10	27.8	45.2
102/198	1	6.8	6.8	8.8	8.8	15.6
	2	1.9	8.7	12.2	21.0	29.7
	3	1.1	9.8	5.8	26.8	36.6
	4	0.95	10.8	3.1	29.9	40.7
	5	0.55	11.3	1.8	31.7	43.0
	6	0.40	11.7	1.5	33.2	44.9
	7	0.39	12.1	1.2	34.4	46.4
	8	0.40	12.5	1.2	35.6	48.0
	9	0.41	12.9	1.0	36.6	49.5
	10	-	13.3	-	37.5	50.7
	11	0.35	13.6	0.80	38.3	51.9
	12	0.26	13.9	0.65	38.9	52.8
	13	0.27	14.2	0.52	39.4	53.6
	14	0.25	14.4	0.46	39.9	54.3
	15	0.22	14.6	0.31	40.2	54.8
	16	0.18	14.8	0.34	40.5	55.3

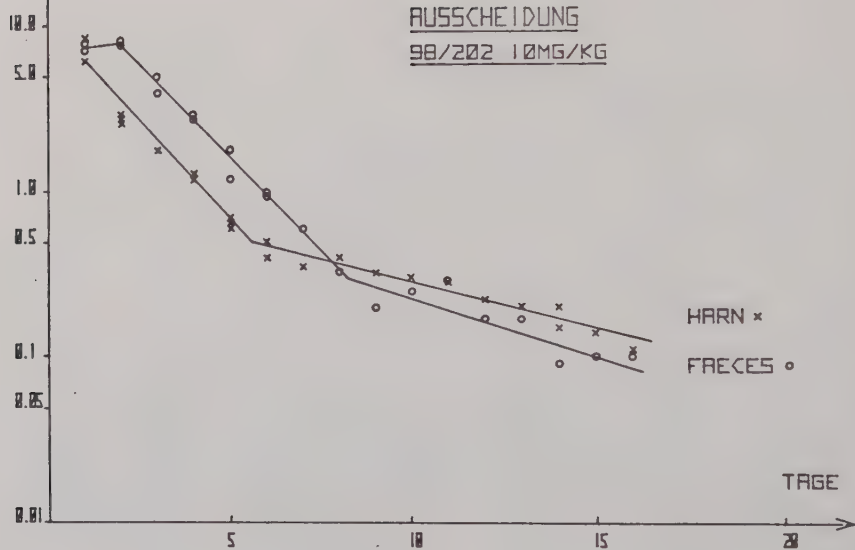
Forts. Tab. 14:

	Tage p. appl.	H a r n		F a e c e s		H a r n u n d F a e c e s gesamtelimin. Dosisanteil p. appl. (%)
		elimin. Dosis- anteil pro Tag (%)	elimin. Dosis- anteil p. appl. (%)	elimin. Dosis- anteil pro Tag (%)	elimin. Dosis- anteil p. appl. (%)	
150/49	1	19.1	19.1	8.1	8.1	27.2
	2	3.3	22.4	8.1	16.2	38.6
	3	1.9	24.3	4.5	20.7	45.0
	4	1.7	25.9	2.1	22.8	48.7
	5	1.6	27.5	2.1	24.9	52.4
	6	1.2	28.7	0.75	25.7	54.4
	7	-	29.8	-	26.4	56.2
	8	1.0	30.8	0.70	27.1	57.9
	9	0.80	31.6	0.55	27.6	59.2
	10	0.80	32.8	0.50	28.1	60.9
	11	0.50	32.9	0.40	28.5	61.4
	12	0.45	33.4	0.30	28.8	62.2
	13	0.40	33.8	0.20	29.0	62.8
	14	0.38	34.2	0.23	29.2	63.4
	15	0.36	34.6	0.16	29.4	64.0
	16	0.24	34.8	0.16	29.6	64.4

Fälle der Ausscheidung für Harn und Faeces deuteten die gefundenen Werte für den Untersuchungszeitraum auf eine zweiphasige Elimination hin. Zur Abschätzung der Linearität der Beziehung wurden für die beiden Eliminationsphasen deren Korrelationskoeffizienten ermittelt. Sie betrugen für 98/202 in der 1. und 2. Eliminationsphase für Harn -0.9 und -0.95 und für Faeces -0.91 und -0.88 ; für 102/198 wurden -0.83 und -0.89 sowie -0.96 und -0.96 gefunden, für 150/49 in der 2. Harneliminationsphase -0.88 und bei Faeces -0.91 und -0.98.

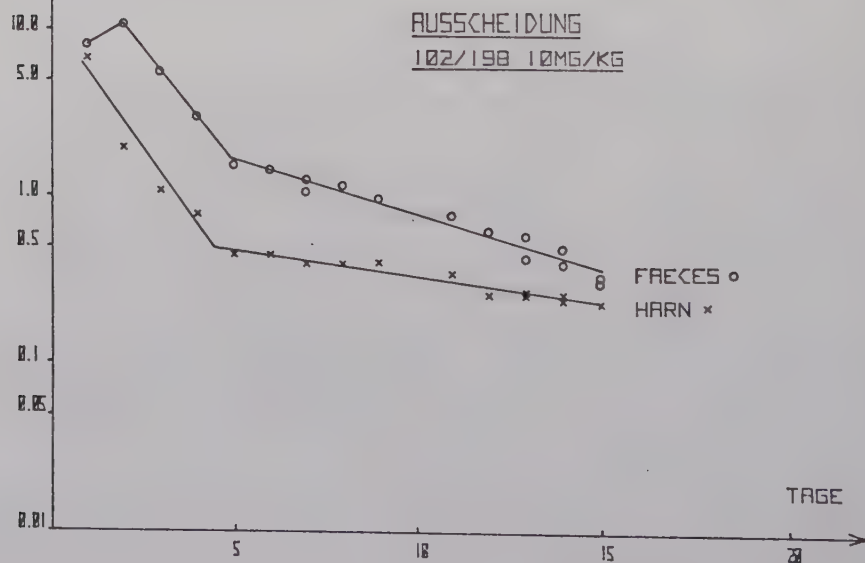
50.0
% APPL. DOSIS

Abbildung 19



50.0
% APPL. DOSIS

Abbildung 20



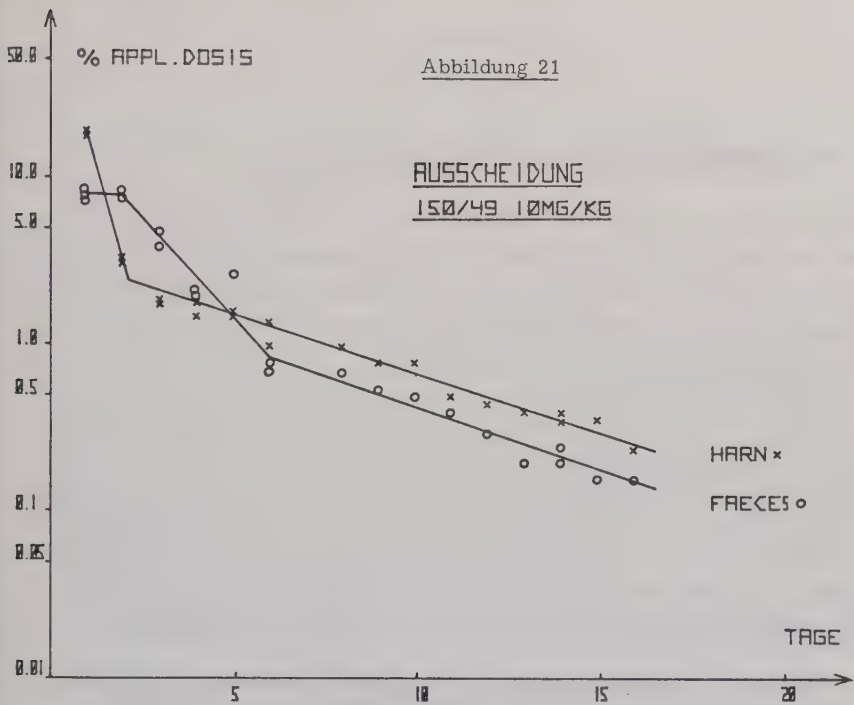
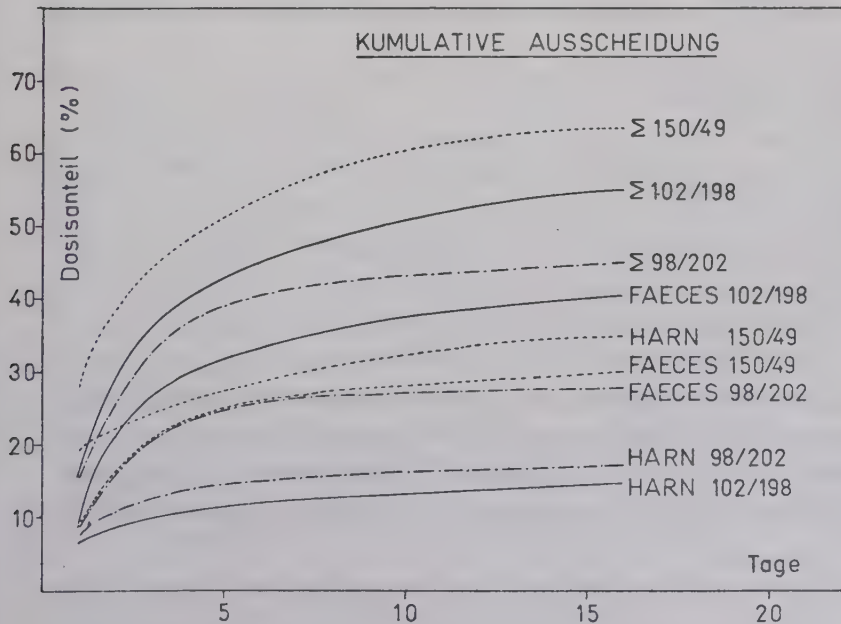


Abbildung 22 : Kumulative Ausscheidung von 98/202, 102/198 und 150/49



3.3.3. Metabolisierung von 192/208 zu 102/198

Der reduktive Ringschluß des 4,4'-Diamidino-1-nitro-desoxy-benzoins, 192/208, zum Indol 102/198 war in vitro durch naszierenden Wasserstoff aus Zinkstaub und Mineralsäure leicht durchzuführen. Es sollte daher untersucht werden, ob diese Umwandlung auch in vivo, während der Mäusepassage des i. p. applizierten 192/208, erfolgt. Dazu wurden 2x5 Mäusen je 10 mg/kg 192/208 als Dihydrochlorid injiziert. 14 Tage lang wurde der 24 Stdn. -Harn gesammelt und auf seinen Gehalt an 102/198 untersucht. Zum Vergleich wurde Leerharn mit 0.2 µg/ml 192/208 (ber. Base) 24 Stdn. bei 37°C inkubiert. Unter diesen Bedingungen trat keine Umwandlung zu 102/198 auf. Die ausgeschiedene Menge Metabolit 102/198 wurde auf die applizierte Dosis 192/208 bezogen und mit der Ausscheidung von 102/198, als solches appliziert (s.Tab. 15), verglichen. Es

Tabelle 15 : Metabolisierung von 192/208 zu 102/198; nachgewiesen durch Ausscheidung von 102/198 im Harn.

Tage nach Applikation	1	2	3	5	6	8	13	14
ausgeschiedene Menge 102/198, bezogen auf appl. Dosis 192/208 (%)	1.0	0.20	0.09	0.050	0.043	0.037	0.019	0.020
ausgeschiedener Anteil 102/198, bezogen auf Applikation von 102/198 (%)	14.8	10.2	8.6	11.8	10.9	9.2	7.1	8.3

zeigte sich, daß bei Applikation von 192/208, ähnliche Pharmakokinetik wie bei 102/198 vorausgesetzt, etwa 7 - 15 % der Substanz zu 102/198 metabolisiert werden. Die *T. congolense* - Wirksamkeit von 192/208 beträgt ebenfalls etwa 10% der von 102/198⁴⁹⁾. In der Tabelle sind die auf die applizierte Dosis 192/208 bezogenen, ausgeschiedenen Mengen 102/198 in

Prozent und pro Tag wiedergegeben, sowie der Prozentsatz gegenüber Applikation von 102/198.

3.3.4. Organkonzentrationen

Die Substanzkonzentrationen im Gewebe wurden nach 1 Tag und nach Versuchsende, d.h. nach 14, 16 oder 17 Tagen bestimmt. Für alle Versuche gilt wieder die Dosierung 10 mg/kg. Die in Tab. 16 wiedergegebenen Werte wurden aus der gemeinsamen Bestimmung einer Gruppe von 5 - 6 Mäusen ermittelt. Die Angaben erfolgten in Konzentrationen µg/g Gewebe und soweit es sich um Bestimmung ganzer Organe handelte als Dosisanteil in Prozent der applizierten Dosis.

Für alle untersuchten Amidine wurde bereits nach 24 Stdn. eine sehr starke Anreicherung in Leber und Nieren gefunden, die etwa das 3000-6000 fache der Serumkonzentration betrug. Nach 14 Tagen trat für die untersuchten Organe eine gewisse Nivellierung der Konzentrationen ein. Bei allen Amidinen konnten auch im Gesamthirn Substanzmengen gefunden werden, die etwa denen in Muskel und Fell entsprachen.

Bei der Chromatographie von direkt aufgetragenem Harn oder Serum sowie von extrahierten, angereicherten Faeces- und Organproben konnten für 98/202, 102/198 und 150/49 keine fluoreszierenden Metaboliten festgestellt werden.

Bei dem verwendeten Chromatographiesystem hätte eine Metabolisierung der Amidinogruppe zum Säureamid oder zur Säure zusätzliche fluoreszierende Flecke mit deutlich von den Diamidinen abweichenden RF-Werten ergeben müssen.

Die Amidinogruppe scheint demnach unter den physiologischen Versuchsbedingungen recht stabil zu sein, eine Beobachtung, die für Pentamidin ebenfalls beschrieben ist ^{75, 84)}.

Tab. 16: Organkonzentrationen bei Maus und Kalb

Substanz Dosis (mg/kg)	Zeit nach Appl. (Tage)	Konzentration der Proben ($\mu\text{g/g}$)	Anteil der appl. Dosis (%)	Organe
98/202 Maus 10	1	69	33.5	Leber
		117	13.6	Nieren
		1.1	0.16	Gehirn
		1.7	---	Fell
		2.6	---	Muskel
	14 - 16	3.5 - 4.5	1.6 - 1.8	Leber
		17.3 - 15.1	2.0 - 1.9	Nieren
		1.0 - 0.8	0.14- 0.11	Gehirn
		1.4 - 1.3	---	Fell
		1.3 - 1.4	---	Muskel
102/198 Maus 10	1	70 - 60	30.5 - 30.7	Leber
		94 - 75	12.2 - 9.3	Nieren
		2.2 - 1.4	0.3 - 0.22	Gehirn
		- 1.6	---	Fell
		2.9 - 2.7	---	Muskel
	14 - 16	11.0 - 8.4	5.8 - 4.0	Leber
		18.2 - 16.7	2.5 - 2.3	Nieren
		0.7 -	0.11- -	Gehirn
		2.3 -	---	Fell
		1.3 -	---	Muskel
150/49 Maus 10	1	63 - 50	30 - 23	Leber
		129 - 105	16 - 11.6	Nieren
		- 0.9	- 0.14	Gehirn
		- 1.3	---	Fell
		- 2.8	---	Muskel
	14 - 17	2.7 - 3.5	1.4 - 1.5	Leber
		14.1 - 14.8	1.9 - 1.8	Nieren
		0.8 - 1.2	0.11- 0.14	Gehirn
		1.2 - 1.4	---	Fell
		1.2 - 1.5	---	Muskel
102/198 Kalb 10	79	100	---	Leber
		61		Nieren
		0.28		Gehirn
		0.42		Fell
		0.56		Muskel
		6.6		Herz

3.4. Orientierender Versuch mit 102/198 beim Kalb

3.4.1. Tierhaltung

Die Möglichkeit zur Untersuchung der Verteilung und Ausscheidung von 102/198 bei einem Bullenkalb der Fleckviehzucht PFEFFER, Annaberg, Niederösterreich, verdanken wir der SANDOZ G.m.b.H., Wien ^{x)}. Während des Versuches wurde das Kalb in einem Stoffwechselkäfig (SFI) gehalten, der das getrennte Auffangen von Kot und Harn ermöglichte. Die Raumtemperatur betrug 22°C bei 48 % rel. Luftfeuchte. Als Futter wurden täglich 2 kg Heu und 2 kg Wiederkäuerhaltungsfutter (RD-1-76) angeboten.

3.4.2. Applikation, Gewinnung und Aufarbeitung der Proben

Das Kalb erhielt eine Dosierung von 10 mg/kg, bei 72 kg Gewicht zu Versuchsbeginn also 1,19 g Dilactat ($\hat{=}$ 720 mg Amidinbase), die in 10 ml sterilisiertem Wasser gelöst waren. Die Injektion erfolgte einseitig in die Glutäenmuskulatur mit einer Kanüle 2R2 Record-Nr. 1.0 und wurde vom Tier relativ gut vertragen.

Serum, Harn und Faecesproben wurden bis zum 79. Tag nach Versuchsbeginn entnommen. Bei Versuchsende wog das Kalb 85 kg. Danach wurde das Tier getötet und zur Organgewinnung seziiert. Von den bereitgestellten Organen wurden Proben von Leber, Nieren, Gehirn, Fell, Muskel und Herz untersucht. Die Probenvorbereitung und Aufarbeitung entsprach der für die Maus entwickelten Methode.

Wegen der unterschiedlichen Beschaffenheit der Exkremente wurden deren Wiederfindungsraten anhand von Leerproben ermittelt.

x) Herrn Dr. H. Mieth und Herrn Dr. G. Petrányi, SANDOZ-FORSCHUNGSINSTITUT, Wien, danke ich recht herzlich für Bereitstellung des Kalbes, Applikation, Tierhaltung und Zurverfügungstellung der Proben.

3.5. Ergebnisse des Kälberversuches

3.5.1. Serumspiegel

Blutproben wurden nach 0.5 Stdn. bis zum 79. Tag nach Applikation untersucht (s. Tab. 13).

Nach 0.5 Stdn. betrug die Serumkonzentration $1.8 \mu\text{g/ml}$. Nach etwa 7 Tagen begann eine konstante Eliminationsphase mit einer Halbwertszeit von 38.5 Tagen und einer Konzentration von $0.065 - 0.049 \mu\text{g/ml}$. Der Serumspiegelwert nach 79 Tagen lag etwas höher als nach der errechneten Eliminationskonstanten zu erwarten, woraus auf eine weitere Eliminationsphase mit noch höherer Halbwertszeit geschlossen werden könnte.

Aus den wenigen Probennahmen war dies jedoch nicht zu beweisen. Ferner müssen bei diesem Versuch die mit der Gewichtszunahme verbundenen veränderten Verteilungsvolumina berücksichtigt werden.

3.5.2. Harn- und Faeceselimination

Zur Bestimmung der Harn- und Faeceselimination wurden Proben nach 1, 2, 4, 7, 15, 19, 23 und 79 Tagen entnommen. Trotz der schwankenden Werte konnte deutlich gezeigt werden, daß die pro Tag ausgeschiedenen Dosisanteile von Harn und Faeces größenordnungsmäßig etwa gleich waren, mit etwas höherer Ausscheidung über die Galle. Die Ergebnisse sind in Tab. 17 wiedergegeben. Für die kumulative Ausscheidung wurden die zwischen den Proben liegenden Ausscheidungsmengen durch Interpolation bestimmt. Nach 79 Tagen waren demnach etwa 8.5 % über den Harn, 10 % über die Faeces, insgesamt 18.5 % der applizierten Dosis ausgeschieden.

Tabelle 17: Harn- und Faeceselimination von 102/198 beim Kalb,
Dosierung 10 mg/kg i.m.

Tag	Pro Tag ausgeschieden:			
	Harnmenge (ml)	Dosisanteil (%)	Faecesmenge (g)	Dosisanteil (%)
1	1200	0.20	1106	0.12
2	2000	0.43	1554	0.08
4	2500	0.38	1450	0.07
7	2000	0.13	1330	0.11
15	-	-	1650	0.14
19	1200	0.08	1710	0.19
23	1300	0.09	1430	0.06
79	1300	0.10	1657	0.21

3.5.3. Organkonzentrationen

Die Bestimmung der Substanzkonzentration im Gewebe von Leber, Nieren, Gehirn, Muskel, Fell und Herz erfolgte nach 79 Tagen. Die Angaben erfolgten (s. Tab.16) in Konzentration $\mu\text{g/g}$ Gewebe; der im gesamten Organ vorhandene Dosisanteil konnte nicht bestimmt werden, da keine entsprechenden Angaben über Gesamtgewicht der Organe vorlagen.

Nach 79 Tagen wurde eine sehr hohe Anreicherung der Substanz in Leber und Nieren gefunden, die das 4000 und 2000fache der Serumkonzentration betrug. Die Anreicherung in Gehirn, Fell und Muskelgewebe betrug etwa das 10 - 20fache, die Anreicherung im Herzmuskel aber etwa das 200fache der Serumkonzentration.

3.6. Vergleichende Betrachtung der Ergebnisse

3.6.1. Vergleich der Diamidine untereinander bei der Maus

Bei der vergleichenden Betrachtung der Diamidine untereinander interessierte vor allem die Korrelation zwischen pharmakokinetischem Verhalten und trypanocider Wirkung der Substanzen.

So sollte das gut *T. congolense* wirksame 102/198 gegenüber 98/202 höhere Serumspiegel und Halbwertszeiten besitzen, 98/202 jedoch die höhere Gewebeaffinität entsprechend dem hauptsächlichen Aufenthaltsort der Parasiten. Die Werte für 150/49 sollten gemäß seiner trypanociden Wirkung dazwischenliegen. Bezüglich der maximalen Serumspiegel trifft diese Abstufung auch zu; so beträgt die Serumkonzentration von 102/198 nach 0.25 Stunden etwa das Fünffache der von 98/202. In beiden Eliminationsphasen sind die Serumspiegel von 102/198 höher als bei 98/202, ferner besitzt ersteres in der 2. Phase auch die doppelte Halbwertszeit. Für 150/49 liegen bis etwa 5 Stunden nach Applikation die Serumspiegelwerte zwischen denen von 98/202 und 102/198, danach jedoch weist es, wegen der längeren Halbwertszeit von etwa 8 Stunden in der 2. Phase, die höchsten Serumspiegel auf.

Diese Betrachtung ist jedoch insofern problematisch, als, obwohl im untersuchten Zeitraum eine zweiphasige Elimination angenommen werden kann, sicher mit späterem Rückfluten von Substanz aus tieferen, fiktiven Kompartimenten zu rechnen ist. Darauf deuten, wie bereits erwähnt, die hohen Distributionskoeffizienten hin. Somit kann sich bezüglich der Höhe der Serumspiegel zu späteren Zeiten, wegen der unterschiedlichen Kinetik der Substanzen, durchaus eine andere Rangfolge ergeben. Dies dürfte wahrscheinlich für 150/49 und 102/198 zutreffen, da 150/49 wesentlich rascher aus dem Organismus ausgeschieden wird.

Im untersuchten Zeitraum entsprechen die Serumspiegel zwar der Erregerspezifität der Diamidine in der Rangfolge, können allein aber die Wirksamkeit der Substanzen, wegen der doch relativ geringen Unterschiede,

kaum erklären.

Ferner besteht eine Diskrepanz zwischen pharmakokinetischen Daten und chemoprophylaktischem Effekt. Bei in vitro-Versuchen mit 102/198 wurde zudem eine wesentlich höhere trypanocide Mindestkonzentration ermittelt, als sie in der 2. Eliminationsphase bei der Dosierung mit 10 mg/kg vorliegt ⁴⁹⁾.

Allerdings kann der trypanocide Effekt auch aufgrund spezifischer Anreicherung der Substanz in den Trypanosomen im Laufe einiger Stunden zustandekommen. Für Stilbamidin wird eine Anreicherung in den Trypanosomen mit dem Faktor 1400 berichtet ³¹⁾.

Während der ersten 24 Stunden konnte bei der Verteilung der Substanzen im Organismus eine für alle Diamidine etwa gleichhohe Affinität zu Leber- und Nierengewebe festgestellt werden. Dieses Anreicherungsverhalten scheint allen aromatischen Diamidinen eigen zu sein (vgl. Kap. 1.4.). Nach 14 bzw. 16 Tagen war die Leberkonzentration für 102/198 jedoch höher als bei 98/202 und 150/49. Nach 24 Stunden beträgt für alle 3 Substanzen die Leber- und Nierenkonzentration etwa das 20-50fache der Konzentration in Gehirn, Haut oder Muskelgewebe. Nach 14 Tagen ist das Verhältnis auf etwa das 5-10fache gesunken. Die Substanzkonzentration der Nieren ist durchweg höher. Bei 150/49 ist dieser Unterschied noch deutlicher. Die Passierbarkeit der Blut-Hirnschranke scheint gut zu sein, da zu Versuchsende die Substanzkonzentration im Gehirn etwa bei 0.7 - 1 µg/g, und damit in der Größenordnung der Konzentration in Fell und Muskel lag (vgl. auch Kap. 1.2. Lit. 43) und 44)).

Jedoch ist eine definitive Aussage über die Passierbarkeit der Blut-Hirnschranke schwer festzulegen, da die im Gehirn gefundenen Substanzmengen auch in den Gefäßwänden und der Hirnhaut lokalisiert sein können. Durch autoradiographische Untersuchungen an Ratten nach Applikation von ¹⁴C - 98/202, 25 mg/kg, wurde eine starke Anreicherung in den Gefäßwänden und der Hirnhaut erkannt ¹³¹⁾.

Bei weiteren Verteilungsversuchen mit markiertem 98/202 wurde ebenfalls hohe Aktivität in der Aortenwand ermittelt ⁸³⁾.

Die Ausscheidung von 98/202 und 102/198 erfolgte zum etwas größeren Anteil über die Faeces. Bei 102/198 beträgt die Faeceselimination nach 16 Tagen etwa 3/4 der Gesamtausscheidung, bei 98/202 etwa 2/3. 150/49 wird etwas stärker über den Harn eliminiert. 150/49 verläßt den Organismus am schnellsten; so waren nach 4,5 Tagen bereits 50 % der applizierten Dosis ausgeschieden, bei 102/198 nach 9,5 Tagen; 98/202 zeigt die längste Verweildauer mit 45 % ausgeschiedenem Dosisanteil nach 15 Tagen. Auch aus der Verteilung der Diamidine im Gewebe und der Ausscheidung aus dem Organismus kann keine eindeutige Erklärung für die Wirkungsspezifität erbracht werden. 98/202 sollte die längste prophylaktische Wirkung gegen die *T. brucei*-Gruppe besitzen.

3.6.2. Vergleich mit literaturbekannten Diamidinen

Ein Vergleich der Blut- bzw. Serumspiegel der untersuchten Diamidine mit Stilbamidin^(R), Pentamidin^(R), Samorin^(R) und Berenil^(R) in vergleichbarer Dosierung bei der Maus kann mangels Angaben in der Literatur nicht gezogen werden. Es wird im allgemeinen von sehr niedrigen Anfangskonzentrationen berichtet, die nach kurzer Zeit auf nicht mehr nachweisbare Konzentrationen absanken. Serumspiegel sind daher nur für höhere Dosierungen oder aber für größere Versuchstiere beschrieben. Zur vergleichenden Betrachtung der Pharmakokinetik dieser Substanzen wurden nur Untersuchungen an Mäusen und Ratten, wegen der Verwandtschaft als Nager sowie der ähnlichen Tierhaltung und Versuchsbedingungen, berücksichtigt. Obwohl qualitativ gleiche Verteilungsmuster gefunden wurden, bestehen quantitativ deutliche Unterschiede zwischen beiden Arten. So sind Blutspiegel und Verteilung sowie Ausscheidung bei der Ratte deutlich verzögert.

Ein Vergleich mit höheren Versuchstieren erschien wegen der völlig anderen Physiologie und Lebensgewohnheiten zu spekulativ.

Für Stilbamidin^(R) wurden nach i.p. Applikation von 50 mg/kg nach 20-30 Min. Serummaxima von etwa 40 µg/ml gefunden, die innerhalb 1 Std. unter 2 µg/ml sanken⁷¹⁾. Bei der Ratte wurden nach 2 Stdn. 0,25 µg/ml bei 10 mg/kg Dosierung gemessen⁸¹⁾. Bei der Maus ist die Ausscheidung, nach Applikation von 20 mg/kg (≈ 10 mg/kg Base) i.v., über die Faeces fast doppelt so hoch wie über den Harn, nämlich etwa 50 % und 30 % der applizierten Dosis nach 5 Tagen; insgesamt sind schon nach 2 Tagen 50 %, nach 4 Tagen 70 % und nach 30 Tagen 97 % ausgeschieden, wobei ebenfalls beim Harn die Hauptmenge, 13,3 %, innerhalb des 1. Tages, bei der Faeces am 2. Tag, ca. 16 % (1. Tag 8,4 %), eliminiert wurde.

Nach 24 Stdn. wurden in den Nieren 17,5 %, in der Leber 31,7 %, im Gehirn 0,03 %, im Fell 0,96 % und im Muskelgewebe 1,95 % der applizierten Dosis gefunden; die Werte nach 14 Tagen betrugen: Nieren 2,55 %, Leber 6,5 %, Gehirn 0,1 %, Fell 0,44 % und Muskel 2,0 %⁸²⁾.

Bei der Ratte wurden, nach ebenfalls 10 mg/kg i.v. Applikation, über Harn und Faeces nach 24 Stdn. 2,5 % und 6,1 % ausgeschieden. Die in Nieren und Leber gespeicherten Substanzmengen betrugen nach 24 Stdn. 8,5 % und 18,8 % und nach 14 Tagen 0,76 % und 6,6 % der injizierten Dosis⁸¹⁾.

Für ¹⁴C-markiertes Pentamidin^(R) fanden Launoy et al.⁸⁴⁾ bei der Maus und der Ratte, mit einer Dosis von 5 mg/kg i.p., schon kurz nach der Injektion keine nachweisbare Menge der Substanz im Blut (also unter 0,1 µg/ml); mit einer Dosierung von 50 mg/kg i.m. bei der Ratte konnten nach 24 Stdn. etwa 0,2 µg/ml Amidin im Plasma ermittelt werden. Mit 5 mg/kg i.p. wurden bei der Maus nach 24 Stdn. insgesamt 25 % der Dosis, nach 5 Tagen 50 % eliminiert. Bei der Ratte und gleicher Dosierung betrug die Gesamtausscheidung nach 24 Stdn. 3,9 %, nach

5 Tagen 25 % und nach 20 Tagen 50 %. Als Hauptspeicherorgane werden ebenfalls Leber und Nieren genannt.

Waalkes et al.⁷⁵⁾ konnten nach 10 mg/kg i.p. Injektion bei der Maus mit der Glyoxal-Methode ebenfalls keine meßbaren Plasmaspiegel nachweisen. Für die Ausscheidung werden nach 18 Stdn. für Harn und Faeces 23 % und 5 %, nach 41 Stdn. 30 % und 8 % sowie nach 90 Stdn. (= 3.8 Tagen) 42 % und 15 % der Dosis angegeben. Nach etwa 3 Tagen sind also 50 % der applizierten Substanzmenge elimiert.

Die Konzentration in den Organen Nieren, Leber und Gehirn wurde nach 24 Stdn. mit 52 µg/g, 28 µg/g und ca. 0.3 µg/g ermittelt, nach 15 Tagen mit 10 µg/g für die Nieren und 2 µg/g für die Leber.

Für Samorin^(R) wurden bei der Ratte nach s.c. Injektion von 60 mg/kg in einem Fall nach 1 Std. 7,5 µg/ml im Plasma gefunden, bei weiteren Proben nach 1-4 oder 24 Stdn. 1.3 µg/ml oder weniger.

Bei i.v. Applikation der gleichen Dosis nach 1 und 1,5 Min. ergaben sich Meßwerte von 1,2 µg/ml und 1.7 µg/ml, danach keine nachweisbaren Konzentrationen.

Nach Injektion von 20 mg/kg s.c., bei der Ratte, fand eine Speicherung der Substanz in den Nieren und der Leber mit etwa 2 % und 10 % nach 24 Stdn. statt, sowie mit etwa 2 % der Dosis in beiden Organen nach 14 Tagen. Nach 24 Stunden waren an der Injektionsstelle noch 30 % der injizierten Menge gebunden⁴¹⁾.

Raether et al.⁷²⁾ fanden für Berenil^(R) bei einer Dosis von 25 mg/kg Berenil-diazetat (50,99 % Basenanteil) s.c. in der Ratte Serumspiegel von 13 µg/ml nach 0,5 Stdn., 2.3 µg/ml nach 4 Stdn. und 0.5 µg/ml nach 15 Stdn. sowie eine zweiphasige Elimination mit Halbwertszeiten von 1,4 und 7,0 Stdn.

Für Berenil werden keine Daten über Ausscheidung und Verteilung im Rattenorganismus berichtet.

Anhand der wenigen in der Literatur beschriebenen Angaben für Serumspiegel, Verteilung und Ausscheidung bei Ratte und Maus in entsprechender Dosierung kann folgende vergleichende Abschätzung gezogen werden: Die verglichenen Diamidine zeigen alle, sowohl für i.p., s.c. und i.v. Applikation, ein starkes Absinken der Serummaxima nach rascher Invasion. Das Abfluten der Substanzen ins Gewebe erfolgt bevorzugt in Nieren und Leber. Die Ausscheidung erfolgt sowohl über Harn als auch Faeces, bei Stilbamidin, 98/202 und vor allem 102/198 bevorzugt über die Faeces, bei Pentamidin und 150/49 bevorzugt über den Harn. Pentamidin wird bei der Maus rascher ausgeschieden als 98/202, nämlich 50 % der Dosis nach ca. 3,5 Tagen bei Pentamidin und nach mehr als 16 Tagen bei 98/202; bei Stilbamidin erfolgt die 50 %ige Ausscheidung bereits nach 2 Tagen. Die besonders gegen *T. congolense* gerichteten Verbindungen Berenil^(R), Samorin^(R) und 102/198 konnten nicht quantitativ verglichen werden, da keine pharmakokinetischen Versuche an der Maus beschrieben sind. Ein abschätzender Vergleich der Serumwerte bei ähnlicher Dosierung von Samorin^(R) und Berenil^(R) bei der Ratte ergibt für Samorin in der 1. Eliminationsphase eher niedrigere Werte. Die 1. Eliminationsphase gleicher Dosierung für Berenil und 102/198 bei der Maus ist größenordnungsmäßig gleich. Anhand der ermittelten pharmakokinetischen Daten sollte die prophylaktische Wirkung der Diamidine 98/202, 102/198 und 150/49 gegenüber den verglichenen Amidinen für die Gewebeparasiten besser sein. Eine vergleichende Aussage über den prophylaktischen Effekt bei den Blutparasiten ist nicht möglich. Die prophylaktische Wirksamkeit von 102/198 scheint jedoch zwischen der von Berenil und Samorin zu liegen (vgl. auch Kap. 3.6.3.).

3.6.3. Vergleich Maus - Kalb

Ein Vergleich der Pharmakokinetik von 102/198 bei Maus und Kalb nach gleicher Dosierung ergab für das Kalb eine wesentlich verzögerte Elimina-

tion bei ähnlicher qualitativer Verteilung. In der langsamen Eliminationsphase stand der Eliminationshalbwertszeit von 4 Stunden bei der Maus eine Halbwertszeit von 38,5 Tagen beim Kalb gegenüber. Während beim Kalb diese Phase bis zum Erreichen der Nachweisgrenze von etwa $0,020 \mu\text{l/ml}$ Serum ungefähr 80 Tage dauert, ist bei der Maus diese Grenze schon nach 13 Stunden erreicht (vgl. Abb. 18 a, b Seite 78).

Beim Kalb waren nach Versuchsende, also 79 Tagen, etwa 18,5 % der applizierten Dosis ausgeschieden, bei der Maus wurde diese Menge bereits nach 1-2 Tagen eliminiert. Die Organkonzentrationen beim Kalb zu Versuchsende beim 79. Tag entsprachen größenordnungsmäßig denen, die nach etwa 24 Stunden bei der Maus auftraten, wobei allerdings gewisse Unterschiede zu verzeichnen waren. So ist beim Kalb die Konzentration in der Leber fast doppelt so hoch wie in den Nieren, bei der Maus ist das Verhältnis umgekehrt; auch die Konzentration im Gehirn scheint gegenüber der Maus kleiner zu sein.

Aus diesen orientierenden Werten ist jedoch deutlich zu sehen, daß eine Vorausbeurteilung der Verteilung und Elimination von Diamidinen bei der Maus nur wenig brauchbare Schlüsse für die Pharmakokinetik bei größeren Versuchstieren zuläßt.

Ähnliche Verhältnisse ermittelten Raether und Mitarbeiter^{72, 127)} beim Vergleich der Pharmakokinetik von Berenil bei Ratte und Rhesusaffen, *macaca mulatta*. Auch hier wurde eine deutlich verzögerte Serumelimination gefunden, mit einer beim Affen fast dreimal höheren Halbwertszeit in der 2. Eliminationsphase.

Ein Vergleich der pharmakokinetischen Daten mit der prophylaktischen Wirkung von Berenil gegen *T. rhodesiense* ergab ebenfalls, daß bereits geringe Serumkonzentrationen genügen, um eine ausgeprägte Prophylaxe zu erreichen⁷²⁾.

Ein Vergleich der Serumspiegel von 102/198 beim Kalb und der Maus mit der prophylaktischen Wirksamkeit von Berenil und 102/198 gegen *T. congolense* bei der Maus läßt beim Rind eine lange Prophylaxe von 2 - 3 Monaten erwarten.

Nach Untersuchungen von F i n k⁴⁹⁾ ergab sich bei einer Dosierung von 10 mg/kg bei der Maus für Berenil nur nach 2 Stunden eine volle prophylaktische Wirkung gegen *T. congolense*, bei 102/198 noch nach 5 Stunden; nach 18 Stunden wurden bei 2 von 5 Mäusen noch inokulierte Parasiten abgetötet.

Die bei der Maus nach 5 und 18 Stunden vorherrschenden Serumkonzentrationen bei gleicher Dosierung betragen 0.085 bis unter 0.02 µg/ml an 102/198, beim Kalb reichen diese Serumkonzentrationen vom 3. Tag bis über den 79. Tag nach Applikation.

4. Allgemeine Angaben zum experimentellen Teil

4.1. Allgemeine Angaben zu präparativen und analytischen Darstellungsmethoden

Alle Schmelzpunkte sind unkorrigiert, zu ihrer Bestimmung diente ein Kupferblock nach Linström.

Unter Vakuum ist das durch Wasserstrahlpumpe erreichbare Vakuum zu verstehen. Alle Analysenproben wurden zunächst 48 Std. bei Raumtemperatur im Vakuumexsikkator über Kaliumhydroxid und Phosphor(V)oxid getrocknet. Das Abdampfen von Lösungsmitteln im Vakuum erfolgte mit einem Rotationsverdampfer BÜCHI-ROTAVAPOR R mit temperierbarem Wasserbad.

Zur Dünnschichtchromatographie wurden selbstbeschichtete Glasplatten, 20 x 20 cm, mit Kieselgel 60 HR MERCK als Adsorbens verwendet. Die Detektion erfolgte im UV-Licht eines FLUOTEST-Gerätes, "Original Hanau" der Quarzlampen GmbH, Hanau, bei 254 oder 360 nm. Als Sprühreagenz diente eine 0.04 %ige, wässrige Lösung von Fluoreszein-Natrium.

Die UV-Absorptionsspektren wurden mit einem ZEISS - Spektralphotometer PMQ II oder DMR 21 aufgenommen, Fluoreszenzspektren mit dem ZEISS-Spektrophotofluorimeter PMQ II mit 2 Monochromatoren (ZFM 4C). Die graphische Darstellung der Spektren und die Berechnung der rel. Fluoreszenzausbeuten wurden mit Hilfe eines HEWLETT-PACKARD - CALCULATORS 9820 A, mit angeschlossenem Plotter durchgeführt ^{x)}.

Die IR-Spektren wurden in KBr-Preßlingen mit einem PERKIN-ELMER-Infracord-Spektralphotometer, Modell 137, aufgenommen, wofür ich Frau Dr. G. Volz danke.

Für die mit dem CH-4 -Gerät der Fa. VARIAN-ATLAS erhaltenen Massen-

x) Herrn Prof. Dr. P. Nickel, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität Würzburg, danke ich herzlich für die Ausarbeitung und Bereitstellung von Programmen zum HP Calculator.

spektren danke ich Herrn Dr. A. Haag, Institut für Organische Chemie der Universität Erlangen-Nürnberg.

Die Titration der Amidinhydrochloride erfolgte entweder wasserfrei mit 0.1 N HClO_4 in wasserfreiem Dioxan oder in wässriger Lösung durch potentiometrische Chloridbestimmung mit 0.1 N AgNO_3 . Zur wasserfreien Titration der Hydrochloride diente ein Titrigraph der Fa. RADIO-METER, Kopenhagen, bestehend aus Titrator TTT 1c, Autobürette ABU 12 und Schreiber SBR 2c.

Die Elektroden bestanden aus einer RADIOMETER-Glaselektrode G 202 C und einer RADIOMETER-Kalomelektrode K 401. Als Lösungsmittel wurde eine 0.1 N Quecksilber(II)acetat-Lösung in wasserfreiem Eisessig, als Maßlösung eine 0.1 N HClO_4 -Lösung in wasserfreiem Dioxan verwendet. Die Titereinstellung der 0.1 N HClO_4 erfolgte mit Kaliumhydrogen-phthalat p.a. in wasserfreiem Eisessig.

Bei der potentiometrischen Chloridbestimmung wurde das entsprechende Salz in destilliertem Wasser unter Zusatz von 2 N Salpetersäure gelöst. Als Meßelektrode diente ein blankes Silberblech und als Bezugslektrode eine gesättigte Kalomelektrode. Die Titrationen erfolgten mit 0.1 N AgNO_3 -Maßlösung unter mechanischem Rühren mit dem Titrigraph der Fa. RADIOMETER, Kopenhagen.

4.2. Geräte für die Tierversuche

Chromatogramm-Spektralphotometer, bestehend aus Spektralphotometer PMQ II mit Chromatogramm-Ansatz, Fa. ZEISS, Oberkochen/Württ., Kompensations-Linienschreiber SERVOGOR, Typ 511, Fa. METRAWATT AG, Nürnberg.

Homogenisator, Typ ho, Fa. BÜHLER, Tübingen.

Ultraschallbad SONOREX, Typ RK 82, 40 kHz, BANDELIN-ELECTRONIC KG, Berlin.

Vakuumtrockenschrank, Typ RVT, Fa. W.C. HERAEUS GmbH, Hanau. MEDVAK-Pumpe, Typ MP 1, Fa. A. PFEIFFER, GmbH, Wetzlar.

Laborzentrifuge PICCOLO, HERAEUS CHRIST GmbH, Osterode/Harz.
Stoffwechselkäfige für Mäuse und Ratten aus Makrolon^R Nr. 13-1700,
Fa. W. EHRET, Emmendingen, mit speziellen, selbst gefertigten Futterbehältern.

Schlagkreuzmühle, STARMIX Type MX, Fa. ELEKTROSTAR.

Rotationsschüttelmaschine, Eigenfertigung (s. Fußnote S. 60), mit stufenloser, elektronischer Drehzahlregelung bis max. 60 Upm, und zweistufigem, mechanischem Getriebe.

OTT-Planimeter Nr. 19 "ELPHOR", Dr. Bender u. Dr. Hobein, München.

Tischrechner H.P. CALCULATOR Mod. 9820 A mit Plotter der Fa.

HEWLETT - PACKARD GmbH, Frankfurt/Main.

Streichgerät für DC-Platten: UNOPLAN, SHANDON Scientific Comp. Ltd., London.

DC-Entwicklungskammer Nr. 120 160 der Fa. DESAGA, Heidelberg, mit 2 nachträglich gebohrten Öffnungen im Deckel zur Chromatographie unter N₂
EPPENDORF-Pipetten mit Polypropylen-Spitzen der Fa. EPPENDORF
Gerätebau Netheler & Hinz GmbH, Hamburg.

Reagiergefäße für Mikroliterbestimmung aus Polypropylen mit anhängendem Stopfen Nr. 39/10 A und Reagenzröhrchen aus Polypropylen Nr. 67/16L 9,5 ml der Fa. W. SARSTEDT, Nümbrecht-Rommelsdorf.

Polypropylenvorratsbehälter, 100 ml, mit Schraubdeckel.

Record- Einmalspritzen 2 ml, PHARMA-PLAST

Record- Einmalkanülen Nr. 20, AMEFA

4.3. Materialien, Reagenzien und Lösungsmittel

Kieselgel 60 HR, reinst nach Stahl, E. MERCK Darmstadt
Aluminiumoxid Woelm basisch DC, ICN, Pharmaceuticals, Eschwege
Glasplatten von gebrauchten Fertigplatten verschiedener Firmen, 200 x 200 mm, 1.0 - 1.3 mm dick.

Extran MA 01, MERCK

Silkospray, Fa. RÜSCH, Rommelshausen/Stuttgart

4.4. Reinigung der Gefäße zum analytischen Gebrauch

Glas- und Polypropylengefäße wurden nach Vorreinigung mit einer weichen Bürste mindestens 12 Std. in einer 3 %igen, 50°C warmen Extran-Lösung eingeweicht und mit Leitungswasser gründlich gespült. Danach gab man die Gefäße in eine 5 %ige wässrige Essigsäure-Lösung; nach frühestens 30 Min. wurde mit Leitungswasser und anschließend 3 mal mit destilliertem Wasser neutralgespült.

Die Trocknung der Polypropylengefäße erfolgte im Trockenschrank bei 60°C, die der Glasgefäße bei 110°C.

Die Reinigung der Quarzglasküvetten zur Photometrie wurde mit Chromschwefelsäure vorgenommen. Nach dem Neutralspülen mit Leitungswasser wurden sie mit 2 N Ammoniakwasser behandelt, um letzte Säurespuren zu beseitigen. Danach erfolgte erneutes Neutralspülen mit Leitungswasser und 4 maliges Klarspülen mit destilliertem Wasser.

5. Arbeitsvorschriften zum Nachweisverfahren

5.1. Präparative und analytische Darstellungen

5.1.1. Oxidationsversuche von 6-Amidino-2-(4-amidinophenyl)thionaphthen zum 1.1.-dioxid

Die Suspension aus 0,238 g (0.5 mMol) 6-Amidino-2-(4-amidinophenyl)thionaphthen-dilactat (98/202) in 0.4 ml Eisessig wurde zum Sieden erhitzt, unter Rühren mit 0.34 ml Wasserstoffperoxidlösung 30 % (3.0 mMol) versetzt und weitere 15 Min. beim Sieden gehalten⁹⁵⁾. Nach dem Abkühlen wurde die gallertige Suspension mit 10 ml 2 N HCl versetzt, wobei ockergelbes, flockiges Produkt ausfiel.

Dieses wurde nach dem Abnutschen mit 20 ml 2 N HCl digeriert, erneut abgenutscht und mit wenig Aceton nachgewaschen.

Das DC (Kieselgel, n-Butanol, 2 N HCl gesättigt) wies 3 im UV-Licht blau fluoreszierende Flecken mit hRF-Werten von 40, 60 und 85 auf, die durch DC-Vergleich dem gewünschten Sulfon, dem Ausgangsprodukt und dessen Säureamid (s. 5.1.2.) zugeordnet werden konnten.

Bei der Schmelzpunktbestimmung des 48 Std. in der Trockenpistole bei 100°C über Phosphorpentoxid und Kaliumhydroxid i.V. getrockneten Produktes trat ab 250°C Schmelzen unter Gasentwicklung auf, bei 270°C war eine teerige Schmelze entstanden.

Verkürzen der Reaktionszeit sowie Verringerung der Wasserstoffperoxid - menge¹³²⁾ auf 0.2 ml (1.75 mMol) ergab nach DC etwa gleiche Menge Säureamid aber weniger Oxidationsprodukt.

5. 1. 2. 6-Carbamoyl-2-(4-carbamoylphenyl) thionaphthen
zum DC - Vergleich

Zu einer Suspension aus 298 mg (1 mMol) 6-Carboxy-2-(4-carboxy-phenyl) thionaphthen in 0.16 ml Pyridin und 20 ml Äther wurden unter Rühren bei 0°C 0.18 ml (288 mg, 2.4 mMol) Thionylchlorid zugegeben. Der Ansatz wurde weitere 5 Min. gerührt und danach 1 Std. im Eisbad stengelassen. Durch Zusatz von 250 ml Dioxan und Erwärmen konnte das entstandene Säurechlorid gelöst werden. Sodann wurde vom verbliebenen Niederschlag abzentrifugiert und die klare, das Säurechlorid enthaltende Lösung zum Säureamid weiterverarbeitet.

Eine Probe der Lösung zeigte im DC (Kieselgel, Benzol-Eisessig, 9+1) im UV-Licht einen gelb fluoreszierenden Fleck bei hRF 87; es war kein Ausgangsprodukt mehr vorhanden.

Die Lösung des Säurechlorids wurde mit 2 ml konz. Ammoniakwasser versetzt und 10 Min. beiseitegestellt. Dann wurde sie in 150 ml Eiswasser gegossen und mit 2 N Salzsäure eben angesäuert. Der erhaltene Niederschlag wurde abgenutscht und mit Wasser gewaschen.

Nach dem Trocknen i. V. bei 60°C wurden 160 mg (54 % d. Th.) weißes Pulver mit Schmp. über 320°C erhalten.

Durch Kristallisation aus Dimethylformamid und zweimaliges Waschen des Niederschlages mit 5 ml Tetrahydrofuran konnte DCreines Säureamid gewonnen werden mit einem im UV-Licht blau fluoreszierenden Fleck bei hRF 10 (Kieselgel, Benzol-Eisessig, 9+1) bzw. hRF 75 (Kieselgel, Dioxan - konz. Ammoniakwasser, 4+1).

IR (KBr): 3580 u. 3300 cm^{-1} ($-\text{NH}_2$ Amidpaar)
1640 cm^{-1} (Amid I), 1605 cm^{-1} (Amid II)

$\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ (296.35)

5.1.3. 2-(4-Cyanophenyl)-4,5-dimethoxybenzotriazol (X)

a) Diazotierung: Die Suspension aus 0.59 g (5 mMol) 4-Aminobenzonitril in 1.5 ml 6 N Salzsäure und 3.5 ml Wasser wurde unter Rühren bei 5°C langsam mit 2.0 ml frisch bereiteter 2.5 molarer Natriumnitritlösung in Wasser versetzt. Nach 5 Min. wurde zur Zerstörung des Natriumnitritüberschusses eine Spatelspitze Amidosulfonsäure zugegeben.

b) Azokupplung: 0.948 g (5 mMol) 4-Aminoveratrol-hydrochlorid wurden in 1.0 ml Wasser gelöst und auf 5°C abgekühlt. Dann wurde die obige Diazoniumsalzsuspension (5 mMol) unter Rühren zugegeben. Der Niederschlag aus dem entstandenen tiefroten Azofarbstoff wurde abgenutscht und mit wenig Wasser mehrmals nachgewaschen. Das Rohprodukt wurde aus Wasser-Äthanol 7+3 umgelöst, abgenutscht und mit 5 ml Benzol nachgewaschen.

Nach 24 Stdn. Trocken i. V. bei 60°C erhielt man 1.3 g (92 % d. Th.) 2-Amino-4'-cyano-4,5-dimethoxyazobenzol (IX) als purpurrotes Pulver, das weiterverarbeitet wurde.

Das DC (Kieselgel HR 60 MERCK, Chloroform-Aceton, 9+1) zeigte einen roten Farbfleck mit R_{RF} 80.

c) Ringschluß: 2.82 g (10 mMol) IX wurden mit 80 ml Pyridin und 10 g (50 mMol) Kupfer(II)acetat versetzt und 45 Min. bei 120°C am Rückfluß im Sieden gehalten. Die anfangs rote Lösung wurde nach ca. 15 Min. grün, und es schied sich ein weißer, flockiger Niederschlag ab. Nach dem Erkalten wurde dieser abgenutscht und mit Wasser von Kupferacetat freigewaschen. Zuletzt wurde mit wenig Methanol nachgewaschen, und das Rohprodukt bei 60°C i. V. getrocknet.

Man erhielt so 2.2 g (79 % d. Th.) beigeresafarbene Kristalle vom Schmp. 318-320°C.

Durch Umlösen aus Toluol unter Zusatz von wenig Aktivkohle wurden 1.9 g (70 % d. Th.) rein weiße Kristalle mit Schmp. 318-320°C erhalten.

Das DC (Kieselgel HR 60 MERCK, Chloroform - Aceton, 9+1) zeigte im UV-Licht einen blau fluoreszierenden Fleck, hRF 70, sowohl für das Rohprodukt als auch für das umgelöste.

IR (KBr) : 2230 cm^{-1} (CN)

MS (70 eV) : m/e 280 $[\text{M}]^{+}$, 265 $[\text{M} - \text{CH}_3]^{+}$, 237 $[\text{265} - \text{CO}]^{+}$

$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2$ (280.27)

5.1.4. 2-(4-Amidinophenyl)-4,5-dimethoxybenztriazol-hydrochlorid (XI)

2.8 g (10 mMol) X wurden in 300 ml über Kalziumchlorid getrocknetem Chloroform suspendiert und zu 15 ml (257 mMol) absol. Äthanol in eine Gaswaschflasche gegeben. Dann wurde unter Eiskühlung 1 Std. lang über konz. Schwefelsäure getrockneter Chlorwasserstoff eingeleitet. Die mit Chlorwasserstoff gesättigte Suspension wurde in eine 0.7 l Sektflasche gefüllt und 3 Wochen bei Raumtemperatur mechanisch geschüttelt. Erst dann war sowohl im IR als auch im DC kein Nitril mehr nachzuweisen.

Der erhaltene Niederschlag wurde im Rotationsverdampfer vom Lösungsmittel und Chlorwasserstoffgas befreit. Sodann wurde das Produkt 2mal mit wenig absol. Äthanol gewaschen, abgenutscht und noch äthanol-feucht zum Amidin umgesetzt.

Obiger Iminoäther wurde erneut in eine 0.7 l Sektflasche gegeben und mit 300 ml, mit trockenem Ammoniakgas gesättigtem, absolutem Äthanol versetzt. Nach weiteren 10 Tagen mechanischen Schüttelns wurde das Rohprodukt am Rotationsverdampfer trockengesaugt. Es wurden so 2.4 g (72 % d. Th.) beiges Pulver erhalten.

Zur Reinigung wurde dieses unter Kühlung mit 2 N Natronlauge digeriert, abgenutscht und mit Wasser laugefrei gewaschen.

Die Amidinbase wurde nun mit 2 N Salzsäure angeteigt, erneut abgenutscht und mit 5 ml 2 N Salzsäure und 10 ml Aceton nachgewaschen.

Die Substanz wurde 24 Std. i. V. über Phosphor(V)oxid und Kaliumhydroxid im Exsikkator und dann 24 Stdn. in der Trockenpistole bei 90°C getrocknet.

Man erhielt so 1.9 g (58 % d. Th.) gelbbeiges Pulver vom Schmp.

350°C; Löslichkeit in Wasser 0.05 %.

Das DC (Kieselgel, n-Butanol - 2 N HCl gesättigt) zeigte einen im UV-Licht blau fluoreszierenden Fleck, hRF 75.

18.36 mg Substanz: 0.536 ml 0.1 N AgNO₃

C₁₅H₁₆N₅O₂Cl (333.8)

Ber. Cl : 10.5 %

Gef. Cl : 10.3 %

UV-Absorptionsspektrum und Fluoreszenzspektrum s. Kap. 2.1.2.2.

5.1.5. Decan-1.10-diamidin-dihydrochlorid¹³³⁾

5.0 g (26 mMol) Decan-1.10-dicyan wurden in 500 ml über Kalziumchlorid getrocknetem Chloroform gelöst, mit 30 ml (514 mMol) absol. Äthanol versetzt und in eine Gaswaschflasche gegeben. Dann wurde 1 Std. lang unter Eiskühlung getrockneter Chlorwasserstoff eingeleitet. Dieser Ansatz wurde in eine 0.7 l Sektflasche überführt und 2 Wochen bei Raumtemperatur mechanisch geschüttelt, bis im IR kein Nitril mehr nachzuweisen war. Sodann wurde vom Niederschlag abgenutscht und 3 mal mit absol. Äther gewaschen. Die anfangs ölig-braune, schmierige Substanz wurde nach dem Ätherwaschen fest und beigefarben.

Der so erhaltene Iminoäther wurde wiederum in eine 0.7 l Sektflasche gegeben und mit 500 ml, mit trockenem Ammoniakgas gesättigtem, absol. Äthanol versetzt 14 Tage geschüttelt. Die entstandene klare, gelbe Lösung wurde zur Gewinnung des Amidins am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Das beigefarbene Pulver wurde mit absol. Äthanol angefeuchtet, abgenutscht und 2 mal mit absol. Äthanol gewaschen. Nun wurde

das Rohprodukt in 40 ml 0.1 N Salzsäure gelöst und 2 mal im Schütteltrichter mit Chloroform gewaschen. Die salzsaure Wasserphase wurde in 500 ml Aceton gegossen, wobei weißes Produkt ausfiel, das noch etwas ammoniumchloridhaltig war. Deshalb wurde das Rohprodukt in wenig Wasser gelöst und unter Eiskühlung mit 2 N Natronlauge versetzt bis keine Fällung mehr auftrat. Die ausgefallene Amidinbase wurde zur Entfernung der Lauge mit Eiswasser und dann mit wenig Aceton gewaschen und abgenutscht. Nach Digerieren der Base mit 2 N Salzsäure und Zugabe von 50 ml Aceton wurde erneut abgenutscht, 3 mal mit 5 ml Aceton nachgewaschen und trockengesaugt. Nach Trocknen i. V. bei 60°C über KOH/P₂O₅ erhielt man 3.1 g (40 % d. Th.) (Lit. 24 %) weißes, kristallines Pulver vom Schmp. 174-176°C (Lit. 174-175°C).

17.54 mg Substanz:

1.17 ml 0.1 N HClO₄

C₁₂H₂₈N₄Cl₂ (299.3)

Ber. Äquiv.-Masse : 149.7

Gef. Äquiv.-Masse : 149.4

5.1.6. Nachweis von Berenil nach Umwandlung zum fluoreszierenden 2-(4-Amidinophenyl)-4.5-dimethoxybenztriazol

1 ml Berenillösung, bis 100 µg berechnet auf die Base enthaltend, wurde mit 0.5 ml 2 N Salzsäure versetzt. Nach Abkühlen im Eisbad erfolgte Zugabe von 0.5 ml Natriumnitrit-Lösung (0.5 %), genau 3 Min. später Zusatz von 0.5 ml Amidosulfonsäure-Lösung (0.5 %). Während der auftretenden Gasentwicklung mußte gut geschüttelt werden; nach weiteren 3 Min. wurden 0.2 ml 4-Aminoveratrol-hydrochlorid -Lösung (0.5 %) zugegeben. Mit 0.5 ml 2 N Ammoniakwasser stellte man einen pH-Wert von 3.5 - 5.5 ein, wodurch eine tiefrote Farbstofflösung erhalten wurde. Diese wurde mit 0.3 ml Kupfer(II)acetat-Lösung (10 %) versetzt und mit einem Trichter bedeckt zur Ringschlußreaktion 10 Min. im siedenden Wasserbad belassen.

Nach dem Erkalten wurde die nun blaue Lösung zur Entfernung des Kupfers auf einer Kieselgel-Dünnschichtplatte über eine 2 cm breite Bande aus bas. Aluminiumoxid chromatographiert mit dem Fließmittel n-Butanol-2N HCl gesättigt.

Die in situ Messung der Fluoreszenz bei etwa hRF 60 erfolgte mit der in Kap. 2.3.2. beschriebenen Meßanordnung und folgenden Gerätedaten:

Anregungswellenlänge	:	313 nm
Wellenzahl der Emission	:	$25.2 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1}$
Monochromatorspalt	:	1.0 mm
Empfindlichkeit Schreiber	:	2 mV
Verstärkung	:	variabel

Nachweisgrenze bezogen auf Berenil: 1 µg/ml.

5.2. Fluorimetrie

5.2.1. Lösungsfluorimetrie

Die Fluoreszenzspektren wurden mit einem ZEISS-Spektralphotofluorimeter PMQ II mit zwei Monochromatoren (ZFM 4C) gemessen. Als Anregungslichtquelle diente ein 500 W Xenon-Hochdruckbrenner XBO 501 der Fa. OSRAM. Die Messungen erfolgten in 10^{-3} molarer Lösung in 1 cm Quarzküvetten bei schräger Küvettenstellung nach der von D a n n und N i c k e l ⁹³⁾ beschriebenen Methode. Zum Vergleich bzw. zur Konstanthaltung der Meßbedingungen diente eine 10^{-3} molare Lösung von 2.5-Diphenyloxazol (POP) in Toluol oder DMF, mit der das Gerät so eingestellt wurde, daß beim Emissionsmaximum von POP am Anzeigegerät 50 Skalenteile erhalten wurden. Folgende Meßbedingungen wurden konstant gehalten:

Lampenstrom	:	22 Ampère
Anregung	:	$\tilde{\nu}$ 32 000 cm ⁻¹ entspr. λ 313 nm
Monochromatorspalt Anregung	:	2.0 mm
Monochromatorspalt Emission	:	0.3 mm

Die so erhaltenen unkorrigierten Intensitätsdaten wurden dem HP CALCULATOR eingegeben und durch den angeschlossenen Plotter in Form der korrigierten Fluoreszenzspektren mit Angabe der relativen Fluoreszenzausbeute ausgedruckt bzw. gezeichnet. Bei Verwendung verschiedener Lösungsmittel wurden die relativen Fluoreszenzausbeuten mit dem Korrekturquotienten n_P^2 / n_S^2 multipliziert, wobei n_P und n_S die Brechungsindices der Lösungsmittel für POP (P) und Substanz (S) bezogen auf die Wellenlänge des Fluoreszenzmaximums darstellen^{91, 134}.

Lösungsfluorimetrische Konzentrationsbestimmungen wurden mit gleicher Geräteanordnung, aber senkrechter Küvettenstellung durchgeführt. Die Anregungswellenzahl wurde entsprechend dem Anregungsmaximum der zu messenden Substanz gewählt, der Monochromatorspalt wurde ganz geöffnet. Am Monochromator für die Emission wurde je nach Konzentration mit variabler Spaltbreite bis 1.0 mm im Fluoreszenzmaximum der einzelnen Diamidine gemessen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über einen Eichstandard; der lineare Meßbereich der wässrigen Diamidinsalzlösungen reichte bis etwa 3 µg/ml.

5.2.2. Beobachtungen über den Einfluß von Lanette E auf die Fluoreszenz von 98/202, 102/198 und 150/49

Obwohl Lanette E, Natriumcetylstearylsulfat, nach Verteilungsversuchen in Wasser-Äthylacetat und in Wasser-n-Oktanol sowohl mit 98/202, 102/198 und 150/49 Ionenpaare bildet, zeigte sich jedoch ein deutlich unterschiedlicher Effekt von Lanette E auf die Fluoreszenz dieser Diamidine in wässriger Lösung.

Ein Vergleich der Lösungen von $2 \mu\text{g/ml}$ ($\hat{=} 0.7 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) Diamidin (ber. Base) in reinem Wasser und in $0.8 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ wässrigen Lanette E-Lösungen ergab für 98/202 eine Fluoreszenzintensitätsminderung um 66 %, für 150/49 um 52 %, für 102/198 dagegen eine Intensitätssteigerung um etwa das 16fache.

Bei allen drei Amidinen wurde durch Zusatz von Lanette E das Anregungsmaximum gegenüber rein wässrigen Lösungen um Wellenzahlen von $500\text{--}700 \text{ cm}^{-1}$ bathochrom verschoben. Die Fluoreszenzmaxima von 98/202, 102/198 und 150/49 zeigten jedoch eine hypsochrome Verschiebung um Wellenzahlen von etwa 100, etwa 400 und etwa 600 cm^{-1} .

In allen Fällen näherten sich also Anregungs- und Fluoreszenzmaxima durch Zusatz von Lanette E. Ein ähnlicher Effekt wurde bei der Verwendung von DMF gegenüber Wasser beobachtet (vergleiche UV-Absorptions- und Fluoreszenz-Spektren in Kap. 2.1.2.2.).

Für 102/198 war die Intensitätssteigerung der Fluoreszenz und die Verschiebung der Maxima von der Lanette E-Konzentration abhängig. Verglichen wurden Lösungen von $1 \mu\text{g/ml}$ 102/198 (ber. Base) in $0.9 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, in $0.9 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ und $0.9 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ wässrigen Lanette E-Lösungen, wobei sich die Anregungsmaxima von Wellenzahl 27100 cm^{-1} auf 27000 cm^{-1} und auf 26000 cm^{-1} verschoben, die Fluoreszenzmaxima von Wellenzahl 21200 cm^{-1} auf 20000 cm^{-1} und auf 18200 cm^{-1} . Die größten Maximaverschiebungen gegenüber der Verwendung von rein wässrigen Lösungen wurden also mit der geringsten Lanette E-Konzentration erreicht.

Die Fluoreszenzintensität stieg bei Verwendung von 10^{-5} M , 10^{-4} M und 10^{-3} M Lanette E-Lösungen von 77 Skalenteilen auf 135 und 837 Skalenteile und war demnach direkt konzentrationsabhängig vom Lanette E-Zusatz.

Weiterhin fiel bei den Verteilungsversuchen auf, daß in einer Äthylacetat gesättigten, wässrigen Lösung von $1 \mu\text{g/ml}$ Diamidin die Fluoreszenzintensität von 102/198 um mehr als das 4fache stieg, die Intensität von

98/202 und 150/49 aber etwa gleichblieb.

Ein ähnliches Verhalten wird für Fluoreszein-Natrium und Eosin-Natrium beschrieben¹³⁵⁾. So bewirkte ein Zusatz von Aceton zu wässrigen Eosin-Na -Lösungen eine konzentrationsabhängige Fluoreszenzintensitätssteigerung, für Fluoreszein-Na dagegen eine Intensitätsminderung.

5.2.3. In situ - Fluorimetrie

5.2.3.1. Geräteeinstellung und Meßdaten

Alle in situ - Messungen wurden mit der in Kap. 2.3.2. beschriebenen Meßanordnung durchgeführt. Der Hg-Mitteldruckbrenner St 41 sowie der Verstärkerteil wurden 20 Min. vor Meßbeginn eingeschaltet. Folgende Geräteeinstellungen blieben für alle Messungen konstant:

Hg-Lampe	:	220 V
Meßfläche	:	Spalt
Tischvorschub	:	Stufe 3
Papiervorschub	:	120 mm/Min.

In Tab. 18 sind die Monochromat-Filter zur Auswahl des Anregungslichtes (λ_A) und die zur Messung der Fluoreszenz üblicherweise benutzten Wellenlängen (λ_E) sowie die damit erfaßten Bandbreiten ($\Delta \lambda_E$) für 1 mm Monochromatorspalt angegeben. Für einen von 1 mm abweichenden Wert der Spaltbreite multipliziert man den angegebenen Wellenlängenbereich mit der Spaltbreite.

Tabelle 18: Wahl der Monochromatfilter zur Anregung und des Meßbereiches der Fluoreszenz mit Angabe der Bandbreite.

	λ_A (nm)	$\lambda_E \cong \tilde{\nu}_E$ (nm) (10^3 cm^{-1})	$\Delta \lambda_E$ (nm)
98/202	313	404.9 $\cong$ 24.7	20.0
102/198	365	450.5 $\cong$ 22.2	27.5
150/49	313	408.2 $\cong$ 24.5	20.0
235/149	313	396.8 $\cong$ 25.2	18.0

Zur Erfassung geringster Substanzmengen öffnete man den Monochromatorspalt bis auf 2 mm, wodurch jedoch, wegen der höheren Untergrundfluoreszenz sowie wegen Störungen durch reflektierte Anregungsstrahlung, schlechter auswertbare Basislinien erhalten wurden.

Schreiberempfindlichkeit und Verstärkung am Anzeigergerät wurden nur so hoch wie unbedingt nötig gewählt, um das Geräterauschen möglichst gering zu halten.

Für 10 ng Substanz pro Fleck erwiesen sich folgende Einstellungen als günstig, bzw. nötig (s. Tab. 19):

Tabelle 19: Geräteeinstellung zur Messung von 10 ng Substanz. E = Schreiberempfindlichkeit, V = Verstärkung, MC = Monochromatorspalt.

	E (mV)	V	MC (mm)	erhaltene Peakfläche (mm ² x)
98/202	2	6/10/I	2.0	1200
102/198	5	5/1/I	1.0	2300
150/49	2	5/1/I	1.0	2200

x) (nur ungefähre Werte; nicht direkt vergleichbar, da auf verschiedenen DC-Platten an verschiedenen Tagen erhalten.)

5. 2. 3. 2. Durchführung der Messung

Nach Auflage der DC-Platte wurde der Meßkopf des Chromatogrammansatzes möglichst weit gesenkt, ohne das Chromatogramm zu berühren. Zur Fokussierung des Fleckes wurde die Blende zunächst auf die ungefähre Position des Flecks eingestellt und dann durch Verschieben des Tisches entlang der x-Achse das Peak-Maximum ermittelt. Die exakte Bestimmung der Koordinaten war nötig, da das Ausrichten der Blende nach dem Fleckmittelpunkt nicht das Peak-Maximum lieferte und bereits Abweichungen von 1 mm bis 5 % Fehler verursachten. Das Fokussieren des Fleckes mußte jedoch rasch erfolgen, da längeres Bestrahlen der Substanz, wie in Kap. 2. 3. 6. beschrieben, Intensitätsverluste mit sich brachte. Sodann wurde der Kreutztisch längs der y-Achse verschoben, bis ein von fluoreszierender Substanz freier Abschnitt der Schicht erreicht wurde. Mit Hilfe der Nullpunktverschiebung des Schreibers wurde der von der Untergrundfluoreszenz herrührende Ausschlag unterdrückt. Dann schaltete man Papiervorschub des Schreibers und Motor des Kreuzzisches gleichzeitig an und erhielt so die Fluoreszenzintensitätsortskurve der Bahn in Laufrichtung des Chromatogrammes. Kurz vor Erreichen des nächsten Substanzfleckes wurde der Kreutztisch angehalten. Positionieren sowie 2maliges Messen der Substanzfleckes konnte so schnell erfolgen, daß die vom Meßspalt begrenzte Fläche weniger als 20 Sek. strahlenbelastet wurde.

5.3. Arbeitsvorschriften zur DC

5.3.1. Herstellen der Dünnschichtplatten

Die für die in situ - Fluorimetrie verwendeten Glasplatten wurden mit Methanol und destilliertem Wasser gewaschen und staubgeschützt getrocknet. Zur Herstellung der Adsorbenssuspension wurden 40 g Kieselgel 60 HR MERCK in einen 250 ml Erlenmeyerkolben mit 80 ml destilliertem Wasser versetzt, mit einem Gummistopfen verschlossen und kräftig angeschüttelt, bis eine dickflüssige Suspension entstanden war. Diese wurde nach 10 Min. Stehenlassen 5 Min. in ein Ultraschallbad gestellt. Die so konglomeratfrei erhaltene Suspension reichte zum Beschichten von 6 Glasplatten 20x20 cm aus. Mit einer Fühlerlehre wurde das Streichgerät auf 0,25 mm eingestellt, wodurch etwa 0,2 mm Schichtdicke erreicht wurden. Durch Klopfen am Streichgerät wurden Unebenheiten in der Schicht ausgeglichen. Die Platten ließ man über Nacht auf einer ebenen Fläche trocknen, danach wurden sie in einen Plattenständer gegeben und senkrecht stehend 1 Std. bei 80°C und eine weitere bei 110°C aktiviert. Die erkalteten Platten wurden in einem Exsikkator aufbewahrt. Bei Streichen und Trocknen der Platten mußte auf größtmögliche Staubbefreiheit sowie Schutz vor Textilfasern geachtet werden.

5.3.2. Auswahl und Vorbereitung der Platten

Durch Sichtauswahl wurden Platten mit Rissen sowie größeren Kieselgelkonglomeraten ausgesondert. Die weitere Auswahl, besonders für die in situ - Fluorimetrie bei niedrigen Substanzkonzentrationen, erfolgte mittels des DC-scanners bei Anregung mit 313 nm, 0,2 mm Monochromatospalt, 2mV Schreiberempfindlichkeit, Verstärkung 5/10/I bei $24,7 \cdot 10^3 \text{ cm}^{-1}$ Emissionswellenzahl. Platten mit unruhiger Basislinie wurden nicht, bzw. nur zur Messung höherer Konzentrationen verwendet. Bei dieser Prüfung konnten auch Verunreinigungen durch Textilfasern mit

optischen Aufhellern rechtzeitig erkannt werden.

Die geeigneten Platten wurden zum besseren Einhalten der Laufrichtung in 10 Bahnen eingeteilt, wie bei Münch¹²¹⁾ beschrieben.

5.3.3. Durchführung der Chromatographie

5.3.3.1. Auftragen der Proben

Das Auftragen der Proben erfolgte mit 5, 10 oder 20 μ l Eppendorf Pipetten mit Hilfe einer Deckplatte zur Auflage der Hand. Vergleichslösungen wurden auf die Bahn 1, 4 und 7 aufgetragen; auf die restlichen Bahnen wurden die Proben verteilt. Jede Probe wurde mindestens 2-3 mal so verteilt aufgetragen, daß benachbarte Bahnen mit unterschiedlichen Proben besetzt wurden.

Beim Auftragen der Proben mußte besonders darauf geachtet werden, die Kieselgelschicht nicht zu beschädigen, da sich die Substanz direkt am Auftragepunkt anreicherte.

Beim Pipettieren von Serum oder Harn wurde jede Probe mit einer neuen Pipettenspitze aufgetragen, da wegen der starken Benetzung bei Benutzen der gleichen Pipettenspitze das Volumen ständig zunahm. Nach Auftragen der Substanzlösung wurde das Chromatogramm 15 Min. bei 50°C im Trockenschrank unter Lichtausschluß getrocknet.

5.3.3.2. Chromatographie unter N₂

Die Chromatogramme wurden unter Stickstoff in einer DESAGA Trennkammer entwickelt. Der Deckel der Kammer war mit entsprechenden Bohrungen und 2 Dreiweghähnen versehen, um diese zu evakuieren und zu begasen, sowie ohne Zutritt von Luft mit Fließmittel zu beschicken. In die Mitte der Trennkammer wurde eine Glasplatte 5x20x0,5 cm gelegt, wodurch Fließmittel gespart wurde, so daß 2 Platten mit 30 ml Fließmittel

entwickelt werden konnten. Nach Abdichten des Schliffes von Deckel und Kammer mit Glycerin wurden 1 oder 2 Dünnschichtplatten in die Kammer gestellt. Man fixierte den Deckel mit 2 Gummibändern und evakuierte die Kammer mittels Wasserstrahlpumpe auf etwa 150 Torr. Das Vakuum wurde bis zu einem geringen Überdruck mit Stickstoff aufgefüllt; zur Kontrolle diente ein angeschlossener Luftballon. Dieser Vorgang wurde 3 mal wiederholt, bis die Kammer möglichst sauerstofffrei war.

Nach Zugabe des frisch mit Stickstoff begasten Fließmittels wurde, unter Lichtausschluß, meist über Nacht chromatographiert; mindeste Entwicklungszeit 8 - 10 Std. Das Fließmittel wurde aus 2 Teilen n-Butanol und 1 Teil 2N HCl bereitet, in einem Scheidetrichter kräftig geschüttelt und 24 Std. zur Sättigung beiseite gestellt. Nach Ablassen der salzsauren Wasserphase war es gebrauchsfertig und konnte mindestens 1 Monat verwendet werden.

5.3.3.3. Vorbereitung der DC zur Messung

Das entwickelte Chromatogramm wurde aus der Kammer genommen und bei 20 Torr und 50°C im Vakuumtrockenschrank vom Fließmittel befreit.

Unter diesen Bedingungen waren die Dünnschichtplatten etwa nach 30 Min. fließmittel-trocken. Exakte Trocknung der Chromatogramme war wegen der in Kap. 2.1.2.2. und 5.2.2. beschriebenen Lösungsmittelabhängigkeit der Fluoreszenz zur quantitativen Bestimmung der Diamidine unbedingt erforderlich.

Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur wurde das Chromatogramm bis zur Messung noch 1/2 - 1 Stde. unter Stickstoff im Dunkeln aufbewahrt.

6. Arbeitsvorschriften für die Tierversuche

6.1. Tierhaltung

Für die Versuche mit Mäusen wurden weibliche Tiere des Stammes NMRI orig. Kißlegg aus den Medizinischen Versuchstierzuchten S. IVANOVAS, Kißlegg/Allgäu, verwendet. Die Tiere erhielten als Standard-Diät Altromin^(R) der Fa. ALTROMIN, Lage/Lippe, das mit einer Kreuzschlagmühle, STARMIX, pulverisiert wurde und Wasser ad libitum. Sie wurden bei täglich 12 Std. künstlichem Tageslicht bei 23-25°C und 55-65 % rel. Luftfeuchtigkeit gehalten. Für die Versuche wurden etwa 8-12 Wochen alte Mäuse mit einem Gewicht von 18-28 g verwendet, die in Makrolon^(R) - Käfigen vorrätig gehalten wurden; der Boden der Käfige war mit Sägespänenstreu ausgelegt.

Für die Ausscheidungsversuche wurden die Mäuse 3-5 Tage vor Versuchsbeginn in die Stoffwechselkäfige der Fa. W. EHRET überführt. Die Reinigung der Käfige erfolgte täglich nach Probenentnahme mit Wasser und weicher Bürste. Nach dem Trocknen der Käfige wurden Auffangkegel und Bodennetz mit Silikonspray behandelt, um ein besseres Abgleiten der Ausscheidungsprodukte zu erreichen.

Die Zeichnung der Tiere wurde mit Pikrinsäurelösung vorgenommen.

6.2. Injektionen

6.2.1. Herstellung der Injektionslösungen

Im folgenden sind die zur Herstellung der Injektionslösungen verwendeten Diamidinsalze mit ihrem Basengehalt wiedergegeben.

Substanz	verwendetes Salz	Basenanteil (%)
98/202	Dilactat	62.0
102/198	Dilactat	60.6
150/49	Dihydrochlorid	79.2
192/208	Dihydrochlorid	81.7
Berenil	Diazeturat	50.99

Die Konzentrationen der verabreichten Injektionslösungen wurden so gewählt, daß sich für alle Dosierungen gleiches Injektionsvolumen, nämlich 10 ml/kg, entsprechend 0.2 ml für eine 20 g-Maus, ergab. Wegen der schlechten Löslichkeit einiger Diamidinhydrochloride wurden die Lösungen mit frisch destilliertem Wasser und nicht mit physiologischer Kochsalzlösung hergestellt.

Die Dosisangaben beziehen sich auf den Basenanteil der Diamidinsalze. Die Injektionslösungen wurden jeweils frisch hergestellt.

6.2.2. Applikation der Injektionslösungen

Unmittelbar vor Applikation der Amidine wurde das Gewicht der Tiere ermittelt. Den Mäusen wurde, entsprechend ihrem Gewicht, die Injektionslösung in den Bauchraum i.p. injiziert. Dabei wurden die Tiere, an Nacken und Schwanzwurzel fixiert, mit dem Kopf nach unten gehalten, um die Eingeweide kopfwärts zu verlagern. Während der Injektion wurde die Bauchdecke der Mäuse entspannt gelassen. Es wurden Einmalspritzen 1.0 ml mit Kanülen Nr. 20 verwendet. Bei Verwendung von Kanülen Nr. 18, für i.p.-Applikation bei Mäusen häufig benutzt, zeigte sich, daß nach Absetzen der Mäuse und erneuter Kontrolle der Injektionsstelle mitunter ein Tropfen der Injektionslösung ausgetreten war. Die bei Kanülen Nr. 20 größere Verletzungsgefahr der Eingeweide ist durch die geschilderte Injektionstechnik zu umgehen.

6. 3. Probengewinnung

6. 3. 1. Serum

Zur Blutentnahme aus dem retroorbitalen Venenplexus bei der Maus wurden heparinisierte Hämatokritröhrchen von 75 mm Länge und 1,3 mm Durchmesser oder selbst heparinisierte Schmelzpunktröhrchen verwendet. Das Eröffnen des Venenplexus erfolgte nach vorsichtigem Durchstoßen der Tenon'schen Kapsel durch leichtes Drehen des Hämatokritröhrchens, um den Sehnerv unverletzt zu lassen. Das blutgefüllte Röhrchen wurde an einem Ende zugeschmolzen und in einer Laborzentrifuge mit speziellem Hämatokritaufsatz zur Gewinnung des Plasmas bei ca. 3000 Upm zentrifugiert. Nach Durchbrechen des Kapillarröhrchens an der Grenzschicht Sediment - Plasma konnte das Plasma mit einer Mikroliterpipette abgezogen werden. Zur Gewinnung größerer Mengen Serum mußten die Mäuse möglichst restlos ausbluten. Dazu wurden sie mit Äther narkotisiert; durch Spannen des Nackenfelles wurde das Blut im Kopf gestaut. Mit einer chirurgischen Pinzette wurde eines der hervorquellenden Augen ruckartig entfernt. Das sofort austretende Blut wurde in einem bereitgestellten Polypropylengefäß gesammelt; nach kurzem Gerinnenlassen wurde durch Zentrifugieren bei 3000 Upm praktisch hämolysefreies Serum gewonnen. Man erhielt so etwa 1 ml Blut pro Maus. Die ausgebluteten Mäuse wurden in Äther getötet. Die Blutgewinnung beim Kalb erfolgte durch Einführen einer Kanüle Nr. 1.0 in eine Halsvene, wobei das ausfließende Blut in einem Polypropylen-Reagenzgefäß gesammelt wurde.

6. 3. 2. Organe

Die narkotisierten, ausgebluteten und getöteten Mäuse wurden mit Stecknadeln auf eine Paraffinplatte gespannt. Sodann wurde der Bauchraum eröffnet und Leber und Nieren entnommen; von der Leber wurde die Gallenblase entfernt. Die Organe wurden oberflächlich mit Filterpapier getrocknet, in tertierte Polypropylengefäße gebracht und sofort gewogen.

Zur Gewinnung der Muskelproben wurde von beiden Hinterbeinen das Fell abgezogen und Muskelstücke aus Ober- und Unterschenkelmuskulatur entnommen, so daß etwa 2 g Material erhalten wurde (bez. auf 5 Mäuse). Die Fellproben von ebenfalls etwa 2 g entstammten aus einem pikrinsäurefreien Teil des Nackenfelles. Sie wurden mit der Schere grob zerschnitten und gewogen.

Zur Freilegung des Gehirns wurde das Kopffell hinter den Ohren aufgeschnitten und nach vorne gezogen. Mit einer Schere wurde die Kopfdecke zwischen den Augenhöhlen und von diesen seitlich bis zu den Ohren aufgeschnitten, so daß sie sich nach hinten aufklappen ließ. Das nun freiliegende Gehirn wurde ganz entnommen und zur Auswaage gebracht.

Diese Operationen dauerten insgesamt 10 Min.

6.3.3. Harn und Faeces

Harn und Faeces wurden in den Stoffwechselkäfigen in getrennten Gefäßen gesammelt. Im Sammelbehälter für den Harn wurden etwa 1 ml 1 N Salzsäure vorgelegt, um den Harn sauer zu halten. Vor Auswechseln der Vorlagen wurden Bondennetz, Ablaufkegel und Ablaufrinne des Käfigs mit wenig destilliertem Wasser ausgespült, um die Harnmenge möglichst quantitativ zu erhalten.

In der 1. Eliminationsphase wurden die Mäuse alle 24 Stdn. in neue Stoffwechselkäfige gegeben, da die Konzentrationsunterschiede pro Tag sehr groß waren. In der 2. Eliminationsphase wurden die Mäuse in den gleichen Käfigen belassen.

Zum besseren Abfließen des Harnes wurden Ablaufkegel, Ablauftrichter und Sammelrinne nach Auswaschen und Trocknen mit Silikonspray benetzt.

6.3.4. Vergleichsproben

Zur Herstellung von Vergleichsproben wurden Serum, Organe, Harn und Faeces unbehandelter Tiere in der oben geschilderten Weise gewonnen. Die Zu-

gabe der Substanz erfolgte in Form der verdünnten Injektionslösung je nach gewünschter Konzentration analog Kap. 5.4.

6.4. Zugabe von innerem Standard

102/198 und 150/49 wurden gegenseitig als innerer Standard verwendet, für 98/202 diente 102/198 als innerer Standard. Die Zugabe richtete sich nach der zu erwartenden Konzentration der Probe, die in einem Vorversuch ermittelt wurde.

Dazu wurden die Proben mit 0.9 % NaCl-Lösung und innerem Standard versetzt (s. Tab. 20) und im Falle der Faeces- und Organproben 5 Min. homogenisiert. Nach 3 Stdn. wurden die Proben aufgearbeitet oder bei -18°C tiefgefroren aufbewahrt.

Die Zugabe der Lösung des inneren Standards sollte nicht mehr als 5 % des Volumens an 0.9 % NaCl-Lösung betragen. Dazu genügten Verdünnungen des inneren Standards von 100, von 10 oder 1 $\mu\text{g/ml}$.

Tabelle 20: Zugabe von innerem Standard und 0.9 % NaCl-Lösung zur Probe

	Serum, Harn	Faeces	Organe
Probe (ml bzw. g)	1.0	3.0	ca. 2.0
NaCl-Lös. 0.9% (ml)	1.0	30.0	20.0
Innerer Standard (ml)	0.02 - 0.05	0.05 - 1.0	0.05 - 1.0

6.5. Extraktion und Anreicherung der Proben

6.5.1. Homogenisieren von Gewebe

Organe und Faeces wurden in 100 ml Polypropylengefäßen mit einem Homogenisator der Fa. E. BÜHLER zerkleinert. Die von der Firma mitgelieferten Rundkolben aus Glas konnten wegen der beschriebenen Glaswandaffinität der Diamidine nicht verwendet werden. Die verwendeten 100 ml-Polypropylengefäße paßten aber ebenfalls in die Dichtungsrillen des Homogenisators, oder aber es wurde, zur Verwendung größerer Messer, der Schraubensatz der Gefäße abgeschnitten und diese in die nächstgrößeren Dichtungsrillen eingesetzt. Nach Anschluß der Wasserkühlung wurde 5 Min. bei Stufe 6 und eine weitere bei Stufe 1 homogenisiert. Zum vollständigen Homogenisieren mußte darauf geachtet werden, daß die Messer möglichst tief ins Gefäß eintauchten. Nach dem Zerkleinern der Proben wurden die Gefäße abgenommen, die Messer mit wenig Wasser nachgespült und die Proben weiter aufgearbeitet.

6.5.2. Extraktion der Diamidine

Zur Extraktion wurden die mit innerem Standard und Kochsalzlösung versetzten und gegebenenfalls homogenisierten Proben nach dem angegebenen Aufarbeitungsschema behandelt (s. S. 124).

Die im Schema angegebenen Volumina für physiologische Kochsalzlösung und 2 N Natronlauge mußten nicht exakt eingehalten werden. Ebenso wurde der Guanidinzusatz nicht genau abgewogen, sondern mit Hilfe eines grob geeichten "Meßgefäßes" (präpariertes Reagenzglas) zugegeben.

Genau zu pipettieren bzw. abzuwiegen waren dagegen die Probenmengen und die Mengen inneren Standards.

Ungenauigkeiten beim Pipettieren der restlichen Volumina wurden durch die Arbeitsweise mit innerem Standard kompensiert.

Aufarbeitungsschema für Serum, Harn, Faeces und Organe mit innerem Standard.

	Serum, Harn	Faeces	Organe	
Probenmaterial (ml bzw. g)	1.0	3.0	2.0-4.0	Proben- vorbereitung und Zugabe innerer Standard (A)
Natriumchloridlösg. 0.9 % (ml)	1.0	30.0	20.0- 40.0	
Innerer Standard -Lösung (ml)	0.02- 0.05	0.05- 1.0	0.05 - 1.0	
3 Stunden bei Zimmertemperatur stehenlassen. Dann in das gleiche Gefäß zugeben:				
Guanidin HCl (g)	0.1	1.5	1.0-2.0	Extraktion (B)
n-Oktanol (ml)	1.0	15.0	10.0- 20.0	
2 N Natronlauge (ml)	0.5	7.5	5.0- 10.0	
15 Min. vorsichtig rotieren - dann 10 Min. bei 5000 U/min zentrifugieren. In die Polypropylen-Mikrolitergefäße pipettieren:				
0.1 N Salzsäure (ml)	0.05		Anreicherung (C) x) abhängig von Probenkonz. mit Leeroktanol auf 0.5 ml er- gänzen	
von obiger Oktanol- phase (ml)	0.05 - 0.5 x)			
n-Heptan (ml)	0.1			
15 Min. rotieren - dann 10 Min. bei 5000 U/min zentrifugieren. Entfernen der Oktanol - Heptan - Phase, pH-Kontrolle der Wasserphase! Entnahme von 5- 10 - oder 20 µl der Wasserphase zur DC				

Je nach Konzentration der Proben wurde nur ein Teil der im Extraktions-schritt B erhaltenen Oktanolmenge zur Anreicherung verwendet, nämlich 0.05 ml bis 0.5 ml, so daß sich für Harn Konzentrationen von 0.02 - 0.2 µg/ml, für Faeces 0.2 - 2.0 µg/ml für Serum und für Organe 1.0 - 10.0 µg/ml ergaben. So konnte die höchst aufgetragene Menge 100 ng Substanz pro Fleck nicht überschreiten.

Probenvorbereitung und Zugabe innerer Standard sowie Extraktion B wurden in den gleichen Gefäßen, in 9 ml- oder 100 ml- Polypropylengefäßen durchgeführt, die Anreicherung C erfolgte in 1.5 ml- Polypropylen-Mikrolitergefäßen.

Mit der angegebenen Methode konnte ein für weite Konzentrationsbereiche einheitliches Aufarbeitungsschema erreicht werden.

6.6. Berechnung der Analysen

Die entsprechend Kap. 6.5.2. aufgearbeiteten Proben wurden mit folgenden, von der Konzentration und Probenart abhängigen Wiederfindungsraten-Quotienten (Wiederfindungsrate Innerer Standard/ Wiederfindungsrate Substanz) berechnet.

	Innerer Standard	Serum	Harn	Faeces	Organe
Konzentrations- bereich (µg/ml, g)		0.02-0.2	0.02-0.2	0.2-2.0	1.0-10.0
WR-Quotient für 98/202	102/198	0.9-1.1	0.5-0.7 ⁺	0.5-0.6 ⁺	0.8-0.95
WR-Quotient für 102/198	150/49	1.2-1.1	1.6-1.3	2.3-2.0	1.4-1.3
WR-Quotient für 150/49	102/198	0.88-0.91	0.63-0.77	0.43-0.5	0.71-0.77

+) Bei Anreicherung mit 0.2 N HCl

Bei dazwischenliegenden Werten wurden die Quotienten durch Interpolieren bestimmt.

Für die Faecesbestimmung von 102/198 beim Kalb wurde ein Wiederfindungsraten-Quotient von 1.45 - 1.55 bei einer Konzentration von 0.5 - 1.0 µg/g gefunden, der damit bei gleicher Aufarbeitung vom Quotienten für Mäusefaeces abwich. Für Harn, Serum und Organproben wurden die entsprechenden Quotienten aus dem Mäuseversuch verwendet.

6.6.2. Berechnung von Harn und Serum

Zunächst wurden die für die Proben gefundenen Peakflächen mit den für die Vergleichslösungen erhaltenen Peakflächen in Beziehung gesetzt und die Probenkonzentration pro Fleck für 10 µl Auftragevolumen berechnet. Die Berechnung wäre über die Peakflächen allein ebenso möglich, erschien aber weniger anschaulich.

Aus der zugesetzten Menge innerer Standard und der gefundenen Menge innerer Standard wurde dessen Wiederfindungsrate in Prozent bestimmt.

Der Gehalt der Probe in µg/ml Harn bzw. Serum ließ sich dann wie folgt berechnen:

$$\text{Gehalt der Probe (} \mu\text{g/ml)} = \frac{K \cdot 0.5}{WR_{IS} \cdot O_V} \cdot Q$$

- | | | |
|------------------|---|---|
| K | : | Konzentration der Probe pro Fleck und 10 µl Auftragevolumen (ng/10 µl) |
| Q | : | Quotient der Wiederfindungsraten s. Kap. 6.6.1. |
| WR _{IS} | : | Gefundene Wiederfindungsrate des inneren Standards (%) |
| O _V | : | Verwendete Menge Oktanolphase (ml) in Aufarbeitungsschritt C s. Kap. 6.5.2. |

Wurde im Konzentrationsbereich von 0.02 bis 0.2 µg/ml gearbeitet und gemäß Aufarbeitungsschema in Schritt C 0.5 ml Oktanolphase verwendet, vereinfacht sich die Gleichung zu:

$$\text{Gehalt der Probe (} \mu\text{g/ml)} = \frac{K}{WR_{IS}} \cdot Q$$

6.6.3. Berechnung von Faeces und Organproben

Entsprechend Kap. 6.6.2. wurden zunächst die Probenkonzentrationen pro Fleck für 10 µl Auftragevolumen und die Wiederfindungsrate des inneren Standards bestimmt.

Die Berechnung des Gehaltes der Probe in µg/g Faeces bzw. Organ wurde nach folgender Gleichung durchgeführt:

$$\text{Gehalt der Probe (} \mu\text{g/g)} = \frac{K \cdot O_g}{O_v \cdot 2 \cdot G \cdot WR_{IS}} \cdot Q$$

K : s. Kap. 6.6.2.

Q : s. Kap. 6.6.2.

WR_{IS} : s. Kap. 6.6.2.

O_v : s. Kap. 6.6.2.

O_g : gesamt eingesetzte Menge Oktanol (ml) in Aufarbeitungsschritt B s. Kap. 6.5.2.

G : Gewicht der Probe (g)

Zur Umrechnung in Dosisanteil (%) der applizierten Substanzmenge wurden für Harn, Faeces und Organe die pro ml bzw. g gefundenen Konzentrationen auf die Gesamtausscheidungs- menge pro Tag bzw. auf das Gewicht des Gesamtorgans bezogen und mit der insgesamt injizierten Substanzmenge in Relation gesetzt.

Für Fell und Muskelproben wurde auf diese Angabe verzichtet, da das Gesamtgewicht hier nur grob zu schätzen ist.

6.6.4. Berechnung der pharmakokinetischen Serumdaten

Die Ermittlung der Regressionsgeraden erfolgte mittels Rechenprogramm durch den HP Calculator A 9820.

Aus zwei auf dieser Geraden liegenden Wertepaaren für Konzentration (y) und Zeit (t) wurde die Eliminationskonstante (k_2) nach folgender Gleichung berechnet:

$$k_2 = \frac{\ln y_1 - \ln y_2}{t_2 - t_1} \quad [h^{-1}] ; \quad (I)$$

aus k_2 erhält man die Serumeliminations-Halbwertszeit ($t_{50\%}$):

$$t_{50\%} = \frac{\ln 2}{k_2} \quad [h] : \quad (II)$$

Aus Gleichung (I) oder durch Verlängern der Regressionsgeraden bis auf den Zeitpunkt t_0 erhält man die fiktive Anfangskonzentration (C_0).

Aus C_0 und der Dosierung erhält man nach $Dost^{129)}$ den Distributionskoeffizienten (Δ):

$$\Delta = \frac{D/KG}{C_0} \quad [ml/g] ; \quad (III)$$

D = Dosis in mg oder μg , abhängig von der Dimension der fiktiven Anfangskonzentration (C_0)

KG = Körpergewicht in g

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) H.A. POINDEXTER, J. Parasitol. 21, 292 (1935)
- 2) L. REINER, C.V. SMYTHE und J.T. PEDLOW, J. Biol. Chem. 113, 75 (1936)
- 3) G.M. FINDLAY, Recent Advances in Chemotherapy, 3. Auflage, Bd. 1, S. 413 f, J. & A. Churchill Ltd., London 1950
- 4) S.R. CHRISTOPHERS und J.D. FULTON, Ann. Trop. Med. Parasitol. 32, 43 (1938)
- 5) N. v. JANSKO und H. v. JANSKO, Z. Immunitätsforsch. Exp. Ther. 86, 1 (1935)
- 6) K. SCHERN und R. ARTAGAVEYTIA-ALLENDE, Z. Immunitätsforsch. Exp. Ther. 89, 21 u. 484 (1936)
- 7) E.M. LOURIE und W. YORKE, Ann. Trop. Med. Parasitol. 31, 435 (1937)
- 8) H. KING, E.M. LOURIE und W. YORKE, Ann. Trop. Med. Parasitol. 32, 177 (1938)
- 9) G. EHRHART und H. RUSCHIG, Arzneimittel, Bd. 5, S. 115 f, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstraße 1972
- 10) MAY & BAKER Ltd. (A.J. EWINS und J.N. ASHLEY), Brit. Pat. 510097 (27. 7. 1939) [C.A. 34, 4079³ (1940)]
- 11) J.N. ASHLEY, H.J. BARBER, A.J. EWINS, G. NEWBERY und A.D.H. SELF, J. Chem. Soc. 1942, 103
- 12) E.M. LOURIE und W. YORKE, Ann. Trop. Med. Parasitol. 33, 289 (1937)
- 13) R. KIRK, Private communication, 1942; ref. unter ¹⁴⁾
- 14) J.D. FULTON und T.W. GOODWIN, J. Pharmacol. Exp. Ther. 84, 42 (1945)
- 15) J.D. FULTON und W. YORKE, Ann. Trop. Med. Parasitol. 36, 134 (1942)

- 16) H.J. BARBER, R. SLACK und R. WIEN, Nature (London) 151, 107 (1943)
- 17) A.J. HENRY, Nature (London) 152, 690 (1943)
- 18) H. JENSCH, Arzneim.-Forsch. 5, 634 (1955)
- 19) FARBWERKE HOECHST AG. (H. JENSCH), D.B.P. 878651
(22.5.1951) [C. 54, 1544 (1954)]
US-Pat. 2673197 (23.4.1954) [C.A. 49, 6303 g (1955)]
- 20) R. FUSSGÄNGER und F. BAUER, Med. Chem. (Leverkusen, Ger.) 6, 504 (1958)
- 21) N.M. BAILEY, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 62, 122 (1968)
- 22) T.J. WATKINS und G. WOOLFE, Nature (London) 169, 506 (1952)
- 23) S.S. BERG, L. BRETHERICK, K. WASHBORN und
W.R. WRAGG, J. Chem. Soc. 1963, 4617 u. 4623
- 24) S.S. BERG, J. Chem. Soc. 1963, 3635
- 25) A. SCHÖNBERG, Präparative organische Photochemie,
Springer-Verlag, Berlin 1958, S. 23
- 26) S. BANCE, H.J. BARBER und A.M. WOOLMAN, J. Chem. Soc.
1943, 1
- 27) O. DANN, E. HIEKE, H. HAHN, H.-H. MISERRE, G. LÜRDING
und R. RÖSSLER, Justus Liebigs Ann. Chem.
734, 23 (1970)
- 28) O. DANN, G. BERGEN, E. DEMANT und G. VOLZ,
Justus Liebigs Ann. Chem. 749, 68 (1971)
- 29) O. DANN, R. FERNBACH, W. PFEIFER, E. DEMANT, G. BER-
GEN, S. LANG und G. LÜRDING, Justus Liebigs Ann. Chem.
760, 37 (1972)
- 30) O. DANN, H. FICK, B. PIETZNER, E. WALKENHORST,
R. FERNBACH und D. ZEH, Justus Liebigs Ann. Chem.
1975, 160
- 31) R.J. SCHNITZER und F. HAWKING, Experimental Chemotherapy,
Vol. 1, S.129 f, Academic Press, New York - London, 1963

- 32) M.H. SATI, Ann. Trop. Med. Parasitol. 43, 4 (1949)
- 33) G.F.T. SAUNDERS, Ann. Trop. Med. Parasitol. 35, 169 (1941)
- 34) T.P. WAALKES, C. DENHAM und V.T. de VITA, Clin. Pharmacol. Ther. 11, 505 (1970)
- 35) V.T. de VITA, M. EMMER, A. LEVINE, B. JACOBS und C. BERARD, N. Engl. J. Med. 280, 287 (1969)
- 36) M. EMMER und V.T. de VITA, Ann. Intern. Med. 69, 637 (1968)
- 37) J.J. WANG, A.J. FREEMAN, J.F. GAETA und L.F. SINKS, J. Pediatr. 77, 311 (1970)
- 38) G.J. LOSOS und E. CROCKETT, Vet. Rec. 85, 196 (1969)
ref. unter ⁹⁾
- 39) E. LINDNER, Bericht aus dem Pharmakol. Labor der Werke Hoechst AG (1956); ref. unter ²⁰⁾
- 40) F.M.J.C. EVENS, Privatmitteilung, ref. unter ²⁰⁾
- 41) F.S. PHILIPS, S.S. STERNBERG, A.P. CRONTIN, J.E. SODER-GREN und P.M. VIDAL, Cancer Res. 27, 333 (1967)
- 42) O. DANN, P.J. WALKER, J. KADDU und J.M.A. WATTS, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 65, 214 (1971)
- 43) T. OGADA, E. FINK und D. MBWABI, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 67, 280 (1973)
- 44) W. RAETHER und H. SEIDENATH, Tropenmed. Parasitol. 27, 238 (1976)
- 45) H. MIETH, Privatmitteilung
- 46) E.M. LOURIE und W. YORKE, Ann. Trop. Med. Parasitol. 33, 289 (1939)
- 47) R. WIEN, Ann. Trop. Med. Parasitol. 37, 1 (1943)
- 48) S.S. BERG, Nature (London) 188, 1106 (1960)
- 49) E. FINK, Privatmitteilung
- 50) P.B. MARSHALL, Brit. J. Pharmacol. 3, 8 (1948)
- 51) F. BAUER, Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. 172, 605 (1958), [C.A. 51, 4574 f (1957)]

- 52) F. HAWKING, ref. unter ³¹⁾, S. 221-229
- 53) J. WILLIAMSON, Exp. Parasitol. 12, 274 (1962), ref. unter ³¹⁾
- 54) J.D. GERATZ, Thromb. Diath. Haemorrh. 23, 486 (1970)
- 55) J.D. GERATZ und W.P. WEBSTER, Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 194, 359 (1971)
- 56) L.J. LOEFFLER, E.-C. MAR, J.D. GERATZ und L.B. FOX, J. Med. Chem. 18, 287 (1975)
- 57) J.D. Geratz, M. C.-F. CHENG und R.R. TIDWELL, J. Med. Chem. 18, 477 (1975)
- 58) P. WALSMANN, H. HORN, H. LANDMANN, F. MARKWARDT, J. STÜRZEBECKER und G. WAGNER, Pharmazie 30, 386 (1975)
- 59) F. HAWKING, J. Pharmacol. Exp. Ther. 82, 31 (1944), ref. unter ³¹⁾
- 60) J.D. FULTON und P.T. GRANT, Exp. Parasitol. 4, 377 (1955), ref. unter ³¹⁾
- 61) B.A. NEWTON und R.W.F. LE PAGE, Biochem. J. 105, 50P (1967)
- 62) W. MÜLLER, Privatmitteilung
- 63) B.A. NEWTON, in Comparative Biochemistry of Parasites (Van den Bossche, ed.), S. 127, Academic Press, New York, London 1972
- 64) R.S. BORNSTEIN und J.W. YARBRO, J. Surgic. Oncol. 2, 393 (1970)
- 65) O.C. WALLIS, J. Protozoal. 13, 234 (1966)
- 66) A.C. ALLISON, Adv. Chemother. 3, 253 (1968)
- 67) R.F. MACADAM und J. WILLIAMSON, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 66, 897 (1972)
- 68) A. GOLDSTONE, E. SZABO und H. KOENIG, Life Sci. 9, 607 (1970)
- 69) J.F. RILEY, The Mast Cells, S. 182, E & S Livingstone, Edinburgh 1959 [C.A. 54, 3538e (1960)]

- 70) T.M. SEED, J.R. SEED und D. BRINDLEY, Tropenmed.
Parasitol. 27, 202 (1976)
- 71) J.D. FULTON und T.W. GOODWIN, J. Pharmacol. Exp. Ther.
84, 34 (1945)
- 72) W. RAETHER, P. HAJDU, H. SEIDENATH und D. DAMM,
Z. Tropenmed. Parasitol. 23, 418 (1972)
- 73) E. FINK und O. DANN, in Actes du colloque: Les Moyens de
lutte contre les Trypanosomes et leurs Vecteurs, S. 297,
Institut d'Elevage et de Medecine veterinaire des Pays
Tropicaux, Paris 1974
- 74) W. DIBBERN, Bericht aus dem Pharma-Untersuchungslabor der
Farbwerke Hoechst AG, 1955
- 75) T.P. WAALKES und V.T. de VITA, J. Lab. Clin. Med.
75, 871 (1970)
- 76) A. SALTZMAN, J. Biol. Chem. 168, 699 (1947)
- 77) A.J. HENRY und D.N. GRINDLEY, Ann. Trop. Med. 36,
102 (1942)
- 78) R. WIEN, Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 39, 455 (1946)
- 79) J.W.F. HAMPTON, Ann. Trop. Med. 41, 226 (1947)
- 80) F. HAWKING und J. SMILES, Ann. Trop. Med. 35, 45 (1941)
- 81) J.D. FULTON und K.K. MATHEW, Brit. J. Pharmacol.
14, 137 (1959)
- 82) J.C. REID und J.C. WEAVER, Cancer Res. 11, 188 (1951)
- 83) E. SCHRAVEN, Privatmitteilung
- 84) M.L. LOUNOY, M. GUILLOT und H. JONCHERE,
Ann. Pharm. Fr. 18, 237 u. 424 (1960)
- 85) A.T. FULLER, Nature (London) 154, 773 (1944)
- 86) A.T. FULLER, Biochem. J. 39, 99 (1945)
- 87) J.B. EKELEY und A.R. RONZIO, J. Am. Chem. Soc.
59, 1113 u. 1118 (1937)
- 88) D.L. WILLIAMS, F.L. SYMONDS, J.B. EKELEY und A.R.
RONZIO, J. Am. Chem. Soc. 67, 1157 (1945)

- 89) D.P. JACKSON, W.J. KUHL und J.L. IRVIN, J. Biol. Chem. 167, 377 (1947)
- 90) J.B. EKELEY und A.R. RONZIO, J. Am. Chem. Soc. 57, 1353 (1935)
- 91) T. FÖRSTER, Fluoreszenz organischer Verbindungen, Verl. Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen 1951,
- 92) E. LIPPERT, Angew. Chem. 73, 695 (1961)
- 93) O. DANN und P. NICKEL, Justus Liebigs Ann. Chem. 667, 101 (1963)
- 94) H. HAHN, Dissertation, Erlangen 1965
- 95) F.G. BERDWELL, B.B. LAMPERT und W.H. McKELLIN, J. Am. Chem. Soc. 71, 1702 (1949)
- 96) H.-H. MISERRE, Dissertation, Erlangen 1966
- 97) M. WARING, Persönliche Mitteilung
- 98) D. WILLIAMSON, Persönliche Mitteilung
- 99) H. LOEWE, Persönliche Mitteilung
- 100) P. RUGGLI und A. COURTIN, Helv. Chim. Acta 15, 75 (1932)
- 101) V. KIDD, J. Org. Chem. 2, 198 (1937)
- 102) E. ROSENHAUER und H. UNGER, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 61, 392 (1928)
- 103) T.A. LAWSON, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 18, 2422 (1885)
- 104) T. ZINKE, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 18, 3132 (1885)
- 105) R. FERNBACH, Dissertation, Erlangen 1969
- 106) V. CHMATAL, J. POSKOCIL und Z.J. ALLAN, Collect. Czech. Chem. Commun. 24, 494 (1959), [C.A. 52, 17245 c (1958)]
- 107) H. FOSTER, J. Am. Chem. Soc. 82, 3780 (1960)
- 108) H. PFITZNER und H. BAUMANN, Angew. Chem. 70, 232 (1958)
- 109) B. PIETZNER, Dissertation, Erlangen, 1972
- 110) N. SEILER, G. WERNER und M. WIECHMAN, Naturwissenschaften 50, 643 (1963)
- 111) E. SAŹICKI, C.W. STANLEY und W.C. ELBERT, J. Chromatogr. 20, 348 (1965)

- 112) R. KLAUS, J. Chromatogr. 16, 311 (1964)
- 113) E. STAHL und H. YORK, Zeiss Information 16, 52 (1968)
- 114) U. HEZEL, Angew. Chem. 85, 334 (1973)
- 115) D. RODER, E. EICH und E. MUTSCHLER, Pharm. Ztg.
115, 1430 (1970)
- 116) N. SEILER und H. MÖLLER, Chromatographia 2, 470 (1969)
- 117) D.L. BALL, W.E. HARRIS und H.W. HABGOOD,
2, 81 (1967), [C.A. 67, 39782 q (1967)]
- 118) H. BRAUNSBURG und S.B. OSBORN, Anal. Chim. Acta
6, 84 (1952)
- 119) N. SEILER und M. WIECHMANN, Z. Anal. Chem. 220, 109 (1966)
- 120) D. JÄNCHEN und G. PATAKI, J. Chromatogr. 33, 391 (1968)
- 121) U. MÜNCH, Dissertation, Erlangen 1972
- 122) G. PATAKI, Chromatographia 1, 492 (1968)
- 123) G. SCHILL, Sv. Farm. Tidskr. 75 (19), 777 (1971)
- 124) K. BEHRENDTS, Z. Anal. Chem. 250, 161 (1970)
- 125) B.B. BRODIE, S.S. UDENFRIEND und J.E. BAER, J. Biol.
Chem. 168, 299 (1947)
- 126) E.B. SCHOENBACH und E.M. GREENSPAN, Medicine 27,
327 (1948)
- 127) W. RAETHER, P. HAJDU, H. SEIDENATH und D. DAMM,
Z. Tropenmed. Parasitol. 25, 42 (1974)
- 128) E.L. GREEN, Biology of the Laboratory Mouse, 2nd ed.,
McGraw-Hill, New York 1966
- 129) F.H. DOST, Grundlagen der Pharmakokinetik, 2. Aufl.,
G. Thieme Verl., Stuttgart 1968
- 130) G. HOFFMANN, Abriß der Laboratoriumstierkunde,
VEB Gustav Fischer Verl., Jena 1961, S. 209
- 131) Z. KOPITAR, Privatmitteilung
- 132) E. HIEKE, Dissertation, Erlangen 1961

- 133) A.P.T. EASSON und F.L. PYMAN,
J. Chem. Soc. 1931, 2991
- 134) LANDOLT - BÖRNSTEIN, Physikalisch-chemische Tabellen,
II. Erg.-Bd., S. 819, und III. Erg.-Bd., S. 1673,
Verl. J. Springer, Berlin 1931 u. 1935
- 135) A.W.M. INDEMANS, Dissertation, Nijmwegen 1953
-

LEBENS LAUF

KALI WODA, Gerald, Kurt, Bruno

Geburtsdaten: 23. November 1944 in Oderberg/Teschen
als einziges Kind des Arztes Dr. Kurt Kaliwoda
und seiner Ehefrau Henriette, geb. Teifel.

Familienstand: Verheiratet seit 26. 8. 1966, 1 Kind

Schulbildung:

1950 - 1954 Urban-Volksschule, Nürnberg
1954 - 1956 Melanchthongymnasium, Nürnberg
1956 - 1964 Realgymnasium, Nürnberg, Abschluß: Abitur

Wehrdienst: 3. / Sanitätslehrbataillon, München

1964 - 1966 Letzter Dienstgrad: Leutnant d.R.

Berufsausbildung:

1966 - 1968 Apothekerpraktikant in der Bindergaß'- Apotheke,
B. Mauser, Nürnberg
23. 9. 1968 Pharmazeutische Vorprüfung in Nürnberg
Mai 1969 - Studium der Pharmazie an der Universität Erlangen-
Februar 1972 Nürnberg
5. Mai 1972 Pharmazeutische Staatsprüfung in Erlangen
28. Juni 1972 Approbation als Apotheker
Ab 15. Juli 1972 Doktorand und wissenschaftliche Hilfskraft
bei Prof. Dr. O. Dann, Lehrstuhl für Angewandte
Chemie, Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Universität Erlangen-Nürnberg.
Seit 1. Mai 1973 Verwalter der Dienstgeschäfte eines wissenschaft-
lichen Assistenten.

Copy-Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30
Tel. 09131-26197